Organizadoras

MÁRCIA EDILAINE LOPES CONSOLARO

SILVYA STUCHI MARIA-ENGLER

CITOLOGIA CLÍNICA CÉRVICO-VAGINAL

TEXTO E ATLAS

CITOLOGIA CLÍNICA CÉRVICO-VAGINAL

TEXTO E ATLAS

Organizadoras

MÁRCIA EDILAINE LOPES CONSOLARO

Doutora em Biologia Celular pela Universidade Estadual de Maringá. Professora Adjunta de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá. Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Universidade Estadual de Maringá.

SILVYA STUCHI MARIA-ENGLER

Doutora em Biologia Funcional e Molecular pela Universidade Estadual de Campinas. Professora Doutora do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Coordenadora da Disciplina Citologia Clínica.

EDITORA ROCA LTDA.
Uma editora integrante do GEN | Grupo Editorial Nacional
Rua Dona Brígida, 701 – Vila Mariana
São Paulo – SP – CEP 04111-081
Tel.: (11) 5080-0770
www.grupogen.com.br | editorial.saude@grupogen.com.br

Capa: Rosangela Bego

Diagramação: Denise Nogueira Moriama

Revisão de Texto: Valquíria Matiolli

Imagens: Rafael Mendonça, Rosangela Bego

- CIP-BRASIL. CATALOGAÇÃO-NA-FONTE
SINDICATO NACIONAL DOS EDITORES DE LIVROS, RJ.

C528

Citologia clínica cérvico-vaginal : texto e atlas / Márcia Edilaine Lopes Consolaro, Silvya Stuchi Maria-Engler. - [Reimpr.]. - São Paulo : Roca, 2014.

Inclui índice

ISBN 978-85-4120-024-0

1. Aparelho genital feminino - Citologia. I. Consolaro, Márcia Edilaine Lopes. II. Maria-Engler, Silvya Stuchi.

12-2090. CDD: 618.107
CDU: 618.1

Aos meus amores, Otávio, Tavinho e Gustavo, pelo encorajamento e suporte.
MARCIA EDILAINE LOPES CONSOLARO

Ao Cláudio, Carlos e Fábio, com amor.
Aos meus estudantes, por me fazerem perguntas tão interessantes.
SILVYA STUCHI MARIA-ENGLER

Agradecemos à Dra. Luisa Lina Villa por sua grandiosa contribuição à Citologia Cervical e HPV, por ser um marco na formação qualificada desses profissionais e cientistas brasileiros.

Prefácio

A citologia cérvico-vaginal é uma das técnicas mais utilizadas em medicina e em saúde pública. Desenvolvida no fim da década de 1920 por George Nicholas Papanicolaou, ela só se estabeleceu como ferramenta de rastreamento do câncer cérvico-uterino no fim da Segunda Guerra Mundial. Mas foi somente nos anos 60 que ela se tornou o método mais importante na prevenção do câncer, após ter sido adotada de forma universal para o rastreamento em países escandinavos, no Canadá e nos Estados Unidos. Nos últimos 50 anos, com a expansão das linhas de conduta por sociedades profissionais médicas e o estabelecimento de programas organizados de rastreio seguindo recomendações da Organização Mundial da Saúde, o exame citológico de Papanicolaou passou a ser o elemento central na prevenção e no controle do câncer mundialmente.

Mas a história continua a ser escrita; novas ferramentas de prevenção do câncer cérvico-uterino apareceram nos últimos 15 anos, especificamente as vacinas contra o vírus do papiloma humano (HPV) e as novas tecnologias moleculares de detecção do HPV para uso no rastreio. Inicialmente adotada nos Estados Unidos para a triagem pré-colposcopia das pacientes com achados de atipias citológicas tipo ASCUS, o teste para tipos oncogênicos do HPV acabou sendo incorporado nas condutas de rastreio. Com o passar do tempo, verificou-se que o grande valor da prova do HPV era em aumentar a sensibilidade do rastreio de lesões cervicais de alto grau ou invasivas por sua baixa taxa de resultados falso-negativos, relativamente à citologia. Essa última, no entanto, tem como grande vantagem a alta especificidade, superior a 95%.

Gradualmente, discutem-se mais e mais as mudanças nos programas de rastreio via incorporação da prova do HPV em paralelo à citologia (já adotada nos Estados Unidos e sendo testada em ensaios clínicos na Europa) ou como teste de rastreio principal com a citologia reservada para a triagem dos casos positivos para o HPV (sob avaliação no Canadá e na Finlândia). Essa última estratégia de testes em série tem a vantagem de diminuir a carga de trabalho dos citotécnicos, já que o trabalho de leitura das lâminas ficaria, então, restrito a cerca de 10 a 15% do volume de casos processados no rastreio. Apesar da penetração gradual da prova do HPV na conduta de rastreio, ela ainda é reservada às mulheres acima dos 30 anos. A significância clínica da positividade para o HPV em uma mulher jovem é muito baixa. A grande maioria das infecções pelo HPV antes dos 30 anos tende a ser transiente, o que diminui muito o valor preditivo positivo dessa prova na detecção das lesões pré-invasivas do colo uterino nessa faixa etária. Portanto, a citologia continua a ser o método único no rastreio do câncer cérvico-uterino em mulheres que iniciam a trajetória de prevenção secundária.

Com a entrada da vacinação em massa contra o HPV na maioria dos países com sistemas de saúde de grandes recursos, a equação da prevenção do câncer de colo começou a mudar de forma dramática. Na Austrália, o primeiro país a incluir a vacinação de meninas de idade escolar em 2007, já se observa redução na prevalência das lesões de alto grau em mulheres de 18 a 20 anos. Outros países, como a Inglaterra e o Canadá, também se beneficiarão do mesmo

efeito em breve, uma vez que ambos adotaram a vacinação em massa em idade escolar. Tal redução certamente se estenderá com efeito de coorte, à medida que mais e mais meninas vacinadas sejam elegíveis para o rastreio e proporcionalmente mais e mais mulheres estejam protegidas contra infecções causadas pelos HPV mais oncogênicos, ou seja, os tipos 16 e 18. As duas vacinas já existentes protegem contra esses dois tipos (uma delas também protege contra HPV 6 e 11, responsáveis pelas verrugas genitais), os quais são responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer de colo uterino. Futuras gerações de vacinas contra o HPV serão polivalentes ou permitirão uma proteção mais abrangente para todos os tipos mucoso-trópicos desse vírus. Embora elas ainda estejam em fase de avaliação clínica em ensaios internacionais, é possível que nos próximos cinco anos essas novas vacinas já estejam aprovadas e comecem a substituir as atuais, que previnem somente contra HPV 16 e 18.

À medida que mais e mais meninas sejam vacinadas e depois atinjam a idade do rastreio, gradualmente haverá redução na prevalência de anomalias citológicas consistentes com lesões pré-cancerosas. Essa diminuição trará um desafio ao papel da citologia e certamente exigirá um maior controle de qualidade para se evitar a perda de atenção advinda da leitura de lâminas, que, na sua vasta maioria, serão normais. Uma solução possível é adotar a estratégia de rastreio em série, com o teste de HPV para todas e a citologia somente para as HPV positivas, conforme descrito anteriormente. A sensatez dessa escolha baseia-se no fato de que a prova do HPV é muito mais sensível e a citologia, um método mais específico. As lâminas destinadas à leitura viriam de mulheres HPV-positivas, o que aumentaria a probabilidade de existência de lesões e, portanto, obrigaria a atenção muito maior da parte do citotécnico para descobrir as anomalias celulares. Métodos que enriquecem o valor preditivo da citologia também estão sendo o alvo de pesquisas, particularmente o uso de coloração imunocitoquímica para revelar células com marcadores moleculares de progressão na carcinogênese.

É nessa fase de transição do papel da citologia que o livro das professoras Márcia Consolaro e Silvya Maria-Engler vem a auxiliar o arsenal dos citologistas brasileiros. Composto de 16 capítulos contribuídos por especialistas de renome nacional e pelas próprias autoras, *Citologia Clínica Cérvico-vaginal: Texto e Atlas* reúne o que é mais relevante na arte e na ciência da citologia cérvico-vaginal. A obra contém capítulos para aqueles que se iniciam na profissão, com conhecimentos úteis sobre anatomia, histologia, abordagem clássica da citologia e interpretação dos achados citológicos, assim como capítulos que cobrem a fronteira científica do papel da citologia e gênese do câncer do colo uterino. Dentre esses últimos, estão revisões da literatura sobre a biologia do HPV e o papel das tecnologias a ele relacionadas, como as vacinas e os métodos de detecção molecular, o efeito da microbiota vaginal e o valor dos marcadores moleculares. Ilustrações de alta qualidade complementam o valor da obra.

Citologia Clínica Cérvico-vaginal: Texto e Atlas é acessível na linguagem àqueles que se iniciam na carreira, sem faltar em sofisticação técnica aos especialistas. A comunidade científica brasileira tem tido uma presença atuante nos avanços tecnológicos da prevenção do câncer cérvico-uterino, e a obra das professoras Consolaro e Maria-Engler faz justiça a essa atuação. Por outro lado, embora o Brasil tenha investido muitíssimo nas campanhas de controle do câncer de colo, essa doença ainda é uma das neoplasias malignas mais comuns no País, particularmente nas regiões menos providas de recursos. É meu profundo desejo que este importante livro sirva de inspiração para aqueles que estão entrando na carreira da saúde a focalizar seus esforços profissionais no combate a essa doença de iniquidade social.

Eduardo L. Franco
Professor Catedrático e Titular
Diretor, Divisão de Epidemiologia do Câncer
McGill University
Montreal, Canadá

Colaboradores

Adagmar Andriolo
Professor Adjunto, Livre-docente, do Departamento de Medicina da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.

Agenor Storti Filho
Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Estadual de Maringá, PR. Citotecnologista pela Fundação Oncocentro de São Paulo e Instituto Adolfo Lutz. Responsável Técnico pelo Setor de Citologia Oncótica do Souza Laboratório de Patologia de Maringá, PR. Consultor Técnico do Ministério da Saúde pelo Departamento de Gestão da Educação em Saúde.

Ana Katherine da Silveira Gonçalves
Doutora em Tocoginecologia pela Universidade Estadual de Campinas. Professora Associada do Departamento de Tocoginecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Pesquisadora Colaboradora da Universidade Estadual de Campinas.

Ana Paula Lepique
Docente do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Andréia Buffon
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Professora Adjunta das Disciplinas de Citologia Clínica e Bioquímica Clínica, do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Cinthia Gandolfi Boer
Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá. Professora Adjunta de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá.

Douglas Munhoz
Médico Patologista no Centro de Atenção à Saúde da Mulher do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Enrique Boccardo
Professor Doutor do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Janaina de Oliveira Crispim
Doutora em Ciências pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Professora Adjunta da Disciplina de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Lara Termini
Pesquisadora Científica do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do HPV na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Pesquisadora no Grupo de Virologia do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer.

Laura Beatriz da Silva Cardeal
Ph.D. em Farmácia, Área de Análises Clínicas, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Pós-doutoramento em Biologia Vascular pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Laura Sichero
Mestre e Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São

Paulo. Pesquisadora do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Investigação Translacional em Oncologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (Icesp).

Luiz Carlos Zeferino
Professor Titular em Ginecologia do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Doutor em Tocoginecologia pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Marco Antonio Zonta
Mestre em Análises Clínicas pela Universidade de Santo Amaro. Doutor em Infectologia pela Universidade Federal de São Paulo. Professor Titular de Patologia e Citopatologia da Universidade de Santo Amaro, Universidade Bandeirante de São Paulo e Centro Universitário São Camilo. Diretor do Laboratório "IN CITO" – Citologia Diagnóstica Ltda.

Maria Cristina do Amaral Westin
Médica Especialista em Anatomia Patológica e Citopatologia. Diretora do Laboratório de Citopatologia do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Mestre em Tocoginecologia pela Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Mariana Clivati Silva
Mestre em Biociências Aplicada à Farmácia pela Universidade Estadual de Maringá. Professora no Curso de Enfermagem da Faculdade Intermunicipal do Noroeste do Paraná.

Monalisa Wolski Pereira
Bióloga, Especialista em Fisiologia Humana. Doutora em Biologia Celular pela Universidade Estadual de Maringá.

Rita Goreti Amaral
Doutora pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Professora Associada da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG) da Disciplina de Citologia Clínica e Estágio Supervisionado em Análises Clínicas no Setor de Citologia e Coordenadora da Unidade de Monitoramento Externo da Qualidade dos Exames Citopatológicos do Colo do Útero. Orientadora no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFG.

Rita Maria do Amparo Bacelar Palhano
Mestre em Histologia e Embriologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Professora Aposentada da Universidade Federal do Maranhão. Professora e Coordenadora do Curso de Especialização em Citologia Clínica da Sociedade Brasileira de Citologia Clínica e Hospital Universitário da UFMa. Responsável pelo Setor de Citologia Clínica do Laboratório Gaspar.

Silvia Helena Rabelo dos Santos
Professora Adjunta IV de Citologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás. Doutora em Tocoginecologia pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Tatiana Rabachini
Mestre e Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Pós-doutora no Instituto de Farmacologia da Universidade de Berna, Suíça.

Vânia Ramos Sela da Silva
Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual de Maringá. Professora Adjunta de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá.

Vera Lúcia Dias Siqueira
Mestre e Doutoranda em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual de Maringá. Professora Associada de Bacteriologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá.

Siglas

AGC = células glandulares atípicas
AGC-NEO = células glandulares atípicas provavelmente neoplásicas
AGC-SOE = células glandulares atípicas sem outras especificações
AIS = adenocarcinoma *in situ*
ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP1 = *associated protein 1*
APC = *adenomatous polyposis coli*
ASC = células escamosas atípicas
ASC-H = células escamosas atípicas de significado indeterminado para lesões de alto grau
ASC-US = células escamosas atípicas de significado indeterminado
ATP = adenosina trifosfato
ATPase = adenosina trifosfatase
BPV-1 = papilomavírus bovino-1 (*bovine papillomavirus-1*)
CA = carboidrato
cAMP = 3′5′-adenosina monofosfato
CB = células basais
CDK = quinase dependente de ciclina (*ciclin-dependent kinase*)
cDNA = DNA complementar
CE = corpos elementares
CEA = antígeno carcinoembriônico (*carcinoembryonic antigen*)
CI = células intermediárias
CLIA 1988 = The Clinical Laboratory Improvement Amendment of 1988
CMV = citomegalovírus
COX2 = cicloxigenase 2
CP = células parabasais
CR = corpos reticulados
CRP = proteína C-reativa (*C-reactive protein*)
CSC = células superficiais cianofílicas
CSE = células superficiais eosinofílicas
CVV = candidíase vulvovaginal
CVVR = candidíase vulvovaginal recorrente
DIP = doença inflamatória pélvica
DIU = dispositivo intrauterino
DNA = ácido desoxirribonucleico
DST = doenças sexualmente transmissíveis
DUM = data da última menstruação
EBV = vírus Epstein-Barr
EGFR = receptor do fator de crescimento epitelial (*epidermal growth factor receptor*)
EV = epidermiodisplasia verruciforme
FDA = Food and Drug Administration
FIGO = *Federation Internationale de Gynecologie et Obstetrique*
FSH = hormônio folículo-estimulante (*follicle-stimulating hormone*)
GnRH = hormônio liberador de gonadotrofina (*gonadotropin--releasing hormone*)
GRE = elementos responsivos a glicocorticoides (*glucocorticoid responsive element*)
hCG = gonadotrofina coriônica humana (*human corionic gonadotropin*)
HDAC = histonas deacetilases

HE = hematoxilina
HH6 = herpes-vírus humano 6
HIV = vírus da imunodeficiência humana
HLA = antígeno leucocitário humano (*human leukocyte antigen*)
HPV = papilomavírus humano (*human papillomavirus*)
HSIL = lesão intraepitelial escamosa de alto grau
HSV = herpes-vírus simples (*herpes simplex virus*)
IC = intervalo de confiança
IDO = indolamina 2,3-dioxigenase
IE = índice de eosinofilia
IFN = interferona
Ig = imunoglobulina
IGF-2 = fator de crescimento semelhante à insulina-2 (*insulin-like growth factor-2*)
IL = interleucina
IM = índice de maturação
JEC = junção escamocolunar
LC-MS/MS = *liquid-chromotography-ion--spray tandem mass spectroscopy*
LDH = lactato desidrogenase (*lactate dehydrogenase*)
LH = hormônio luteinizante (*luteinizing hormone*)
LPS = lipopolissacarídio
LSIL = lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
MALD-TOF = *matrix-assisted laser--desorpition-ionization time-of-flight*
MBL = lectina ligadora de manose (*mannose-binding lectin*)
MEC = matriz extracelular
MEE = metaplasia escamosa endometrial
MHC = complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*)
MMP = metaloproteínase
MØ = macrófago
Mo = monócito
MOMP = importante proteína de membrana externa (*major outer membrane protein*)
MPA = metaplasia papilar imatura atípica
NFκB = fator nuclear κB (*nuclear factor κB*)
NFI = *nuclear factor I*
NIC = neoplasia intraepitelial cervical
NIV = neoplasia intraepitelial de vulva
NIVA = neoplasia intraepitelial vaginal
NK = *natural killer*
NO = óxido nítrico
OMS = Organização Mundial da Saúde
OR = *odds ratio*
PCR = reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
PGRSS = Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde
PIGF = fator de crescimento placentário
PMN = polimorfonuclear
pRB = proteína do retinoblastoma
PV = papilomavírus
RDC = Resolução da Diretoria Colegiada
RE = retículo endoplasmático
RNA = ácido ribonucleico
RNAr = RNA ribossômico
ROC = Receiver Operating Characteristic
SAGE = análise em série da expressão gênica (*serial analysis of gene expression*)
SCC = *squamous cell carcinoma*
SCCA = antígeno de carcinomas de células escamosas
SELDI = *surface enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry*
SIL = lesões intraepiteliais escamosas
SISCOLO = Sistema de Informação do Câncer do Colo do Útero
SNC = sistema nervoso central
SUS = Sistema Único de Saúde

TCR = receptor de células T (*T-cell receptor*)
TGF = fator de crescimento transformador (*transforming growth factor*)
TLR = receptores tipo *toll* (*toll-like receptors*)
TMA = microarranjo de tecido (*tissue microarray*)
TNF = fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*)
TP53 = *tumor protein 53*
Tregs = células T reguladoras
TRH = terapia de reposição hormonal
UMEQ = Unidade de Monitoramento Externo da Qualidade
VB = vaginose bacteriana
VEGF = fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*)
VLP = partículas semelhantes a vírus (*virus-like particles*)
VPF = fator de permeabilidade vascular (*vascular permeability factor*)
VZV = vírus da varicela-zoster
ZT = zona de transformação
MME = metaplasia escamosa endometrial

Instituições e Formadores de Opinião

1. **SBBC – Sociedade Brasileira de Biologia Celular.** Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, 05508-000, São Paulo. CNPJ 61849352/0001-00. sbbc@icb.usp.br. www.sbbc.org.br
   Contato: Dra. Vilma Martins
2. **SBCC – Sociedade Brasileira de Citologia Clínica.** Contatos: Carlos Eduardo de Queiroz Lima, Presidente da Sociedade Brasileira de Citologia Clínica. (81) 9262-4725; ceql@uol.com.br
   Rita Maria do Amparo Bacellar Palhano, Vice-Presidente da Sociedade Brasileira de Citologia Clínica. (98) 3226-5568/(98) 9605-5134; ritabp@terra.com.br
3. **Conselho Federal de Farmácia.** Contato: Carlos Eduardo de Queiroz Lima, Conselheiro do Conselho de Farmácia. (81) 9262-4725; ceql@uol.com.br
4. **Conselho Federal de Biomedicina.** Contato: Daiane Camacho, Conselheira do Conselho de Biomedicina. daiane_camacho@yahoo.com.br

Índice

Capítulo 1

Anatomia, Histologia e Citologia Normal do Trato Genital Feminino

Andréia Buffon

ANATOMIA E HISTOLOGIA DA VULVA, DA VAGINA, DO ÚTERO, DAS TUBAS UTERINAS E DOS OVÁRIOS

Desde as primeiras publicações, indicando achados celulares anormais nos líquidos corporais, como as de Donné[1], em 1845, e Pouchet[2], em 1847, na França, e mais tarde com os trabalhos de Papanicolaou[3] e Babes[4], em 1928, a citologia esfoliativa impôs-se como uma importante ferramenta na prevenção e no tratamento do câncer de colo do útero. Considerada uma técnica simples na sua execução e com um custo relativamente baixo, tem proporcionado diminuição considerável nas taxas de mortalidades causadas pelas neoplasias cervicais.

Nesse sentido, é fundamental a compreensão acurada do local de coleta do material a ser analisado, bem como a identificação adequada dos elementos presentes nos raspados ecto e endocervicais, durante a realização do exame de Papanicolaou. Portanto, neste capítulo, serão abordados os aspectos anatômicos, histológicos, bem como a citologia normal, do trato genital feminino.

O trato genital feminino é constituído pelos órgãos genitais externos e pela vulva; os internos, pela vagina, pelo útero, pelas tubas uterinas (trompas de Falópio) e pelos ovários, que estão localizados no interior da cavidade pélvica (Figura 1.1).

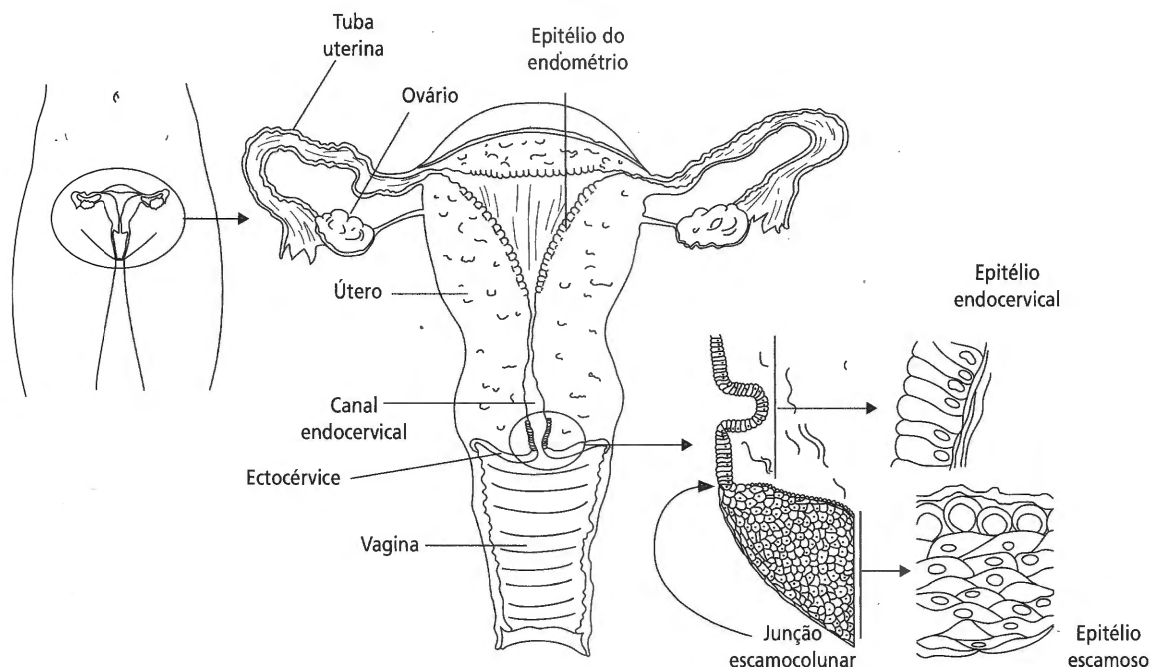



Figura 1.1 – *Trato genital feminino.* Esquema do trato genital feminino, representando a vagina, o útero, as tubas uterinas, os ovários e a junção escamocolunar (JEC), com destaque para os epitélios endocervical e escamoso.

978-85-4120-024-0

Vulva

Anatomia

A vulva compõe os genitais externos do trato genital feminino, que se estende desde o monte de vênus até a região do períneo. É constituída, portanto, pelo monte de vênus, pelos grandes e pequenos lábios, pelo clitóris, pelo prepúcio, pelo vestíbulo, pelo meato uretral, pelas glândulas de Bartholin e de Skene (parauretrais) e pelo introito (óstio) vaginal, onde está localizado o hímen[5,6]. A drenagem sanguínea da vulva é constituída pelas artérias pudendas internas, pelo ramo das ilíacas internas e pelas pudendas externas. A drenagem linfática concentra-se em vasos que drenam para os gânglios linfáticos inguinais e femorais[6].

Histologia

O monte de vênus, localizado à frente pubiana, é rico em tecido adiposo e recoberto por pelos. Os grandes lábios são formados por duas pregas espessas de pele, também revestidos por pelos, e se estendem do monte de vênus até o períneo[7]. Os pequenos lábios estão situados entre os grandes lábios e são duas pregas menores de pele, apresentando ausência de pelos. Seu epitélio é estratificado pavimentoso queratinizado, assim como a face interna dos grandes lábios e o clitóris, uma estrutura erétil e que apresenta inúmeras terminações nervosas[5]. O vestíbulo, região situada entre os pequenos lábios, é onde se localiza a entrada da vagina. As glândulas de Skene estão localizadas em ambos os lados do meato urinário, ao passo que, por toda a extensão do vestíbulo, localizam-se as glândulas vestibulares menores. Situadas, uma em cada lado do vestíbulo, há ainda as glândulas de Bartholin, também chamadas de glândulas vestibulares maiores[8,9].

Vagina

Anatomia

A vagina é formada por um tubo fibromuscular de 7 a 9 cm de comprimento e comunica-se superiormente com o canal cervical, onde sua extremidade envolve o colo do útero, e inferiormente até o vestíbulo[6]. Esse órgão situa-se

posteriormente à bexiga e à uretra e anteriormente ao reto. Para fins de estudo, a vagina apresenta quatro fundos de saco, um anterior, dois laterais e um na parte posterior, sendo esse o mais profundo. Nas mulheres virgens, o óstio da vagina é parcialmente fechado pelo *hímen*, uma fina membrana de tecido conjuntivo situada na entrada do canal vaginal e forrada por mucosas interna e externa[8]. A porção denominada *foice da vagina* (fundo de saco) é a parte que está em contato com a região do colo do útero[6].

O suprimento arterial vaginal origina-se de um ramo da artéria ilíaca interna, a artéria vaginal. A drenagem venosa da vagina é formada pelos plexos venosos vaginais ao longo das paredes e dentro da camada mucosa. Esse conjunto de veias é contínuo com os plexos venosos uterino e uterovaginal. Os vasos linfáticos vaginais drenam a parte superior da vagina para os linfonodos ilíacos internos e externos, a parte média para os linfonodos ilíacos internos e a parte inferior para os linfonodos sacrais e ilíacos comuns, bem como para os linfonodos inguinais superficiais. A inervação na vagina provém dos plexos hipogástricos inferiores[8].

Histologia

A parede vaginal é formada por três camadas: uma mucosa; interna, constituída de epitélio pavimentoso estratificado; uma camada muscular intermediária, composta do músculo liso; e uma adventícia externa, de tecido conjuntivo denso. O epitélio da camada mucosa contém glicogênio e está dividido nas seguintes camadas: basal (uma camada de células), parabasal (de duas a cinco camadas de células), intermediária e superficial, com número de camadas variável. Abaixo desse epitélio, localiza-se a lâmina própria, formada por tecido conjuntivo, fibras elásticas, nervos e alguns vasos sanguíneos. Durante o período de amamentação e na pós-menopausa, esse epitélio pode sofrer atrofia e ter seu número de camadas celulares reduzido. A parede da vagina não possui glândulas, entretanto a superfície da mucosa é mantida úmida pelo muco secretado pelas glândulas uterinas, pelas glândulas endocervicais e pelas glândulas de Bartholin, no vestíbulo[5].

O epitélio vaginal responde às mudanças cíclicas durante o ciclo menstrual, sendo sua diferenciação estimulada por estrógenos. O esfregaço vaginal pode refletir os níveis de estrógenos e progesterona durante o ciclo menstrual e ainda auxilia no monitoramento dos níveis hormonais durante a gestação (ver detalhes no Capítulo 2).

Útero

Anatomia

O útero é um órgão muscular, côncavo e de paredes espessas. Geralmente está localizado na pelve menor, entre a bexiga e o reto, embora possa variar de forma, tamanho, localização e estrutura, de acordo com a idade, a paridade e a estimulação hormonal. O útero mede cerca de 7 cm de comprimento, 5 cm de largura e 2,5 cm de espessura[7].

Esse órgão está dividido em duas partes: o colo e o corpo do útero[5]. O corpo uterino representa dois terços superiores e possui duas partes, o fundo, que é a parte do corpo acima dos pontos de entrada das tubas uterinas, e o istmo, região relativamente constringida do corpo, logo acima do colo do útero. A parede do corpo do útero possui uma túnica serosa, uma túnica muscular média e uma túnica mucosa interna. A túnica serosa, ou perimétrio, é o peritônio, sustentado por uma fina camada de tecido conjuntivo. Constituindo a maior parte da parede do útero, o miométrio, ou túnica muscular média, é denso, formado por músculo liso suportado por tecido conjuntivo. É firme nas mulheres nulíparas e torna-se muito distendido durante a gravidez. A túnica mucosa, ou endométrio, é contínua através das tubas uterinas[6]. É a região preparada para a implantação do óvulo fecundado. Sendo assim, sofre modificações com a fase do ciclo menstrual ou durante a gravidez, em resposta aos hormônios produzidos pelos ovários.

O colo é a extensão inferior do útero, projetando-se na parede anterior da vagina, o que o divide em regiões supravaginal, com maior quantidade de fibras musculares lisas, e vaginal, que apresenta maior concentração de tecido

conjuntivo e é a região visualizada durante o exame com espéculo[6]. Faz a comunicação entre a cavidade uterina e a vagina pelo óstio do útero, sendo revestido por uma membrana mucosa denominada porção interna do colo do útero, ou *endocérvice*, e corresponde ao *canal endocervical*. A porção externa do colo do útero, que se estende do óstio do útero (externo) ao fórnix da vagina, é chamada de *ectocérvice* e é revestida por epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado, similar ao epitélio vaginal[9]. A principal função desse epitélio escamoso é proteger a cérvice e a vagina de agentes químicos, físicos e microbiológicos[10].

O suprimento sanguíneo do útero é constituído, principalmente, pelas artérias uterinas e também pelas artérias ováricas. Juntamente com as artérias, as veias uterinas formam um plexo venoso em cada lado do útero, e as veias provenientes do plexo uterino drenam para as veias ilíacas internas. Quanto à drenagem linfática do útero, a maioria dos vasos do fundo do útero passa para os linfonodos lombares, os provenientes do corpo do útero passam em direção aos linfonodos ilíacos externos e os vasos do colo do útero passam para os linfonodos ilíacos internos e sacrais[6]. Os nervos simpáticos e parassimpáticos dos ramos dos plexos hipogástricos inferiores são responsáveis pela inervação uterina[8].

Histologia

Epitélio escamoso estratificado não queratinizado

O epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado (epitélio escamoso) apresenta-se diferenciado em várias camadas de células: basal, parabasal, intermediária e superficial[5] (Figuras 1.2 e 1.3). A camada basal é constituída por uma única camada de células pequenas e com capacidade mitótica, apoiada pela lâmina basal. A camada parabasal pode apresentar várias camadas de células, maiores que as da camada basal, e tem papel importante na regeneração epitelial. A diferenciação e a maturação das células para-

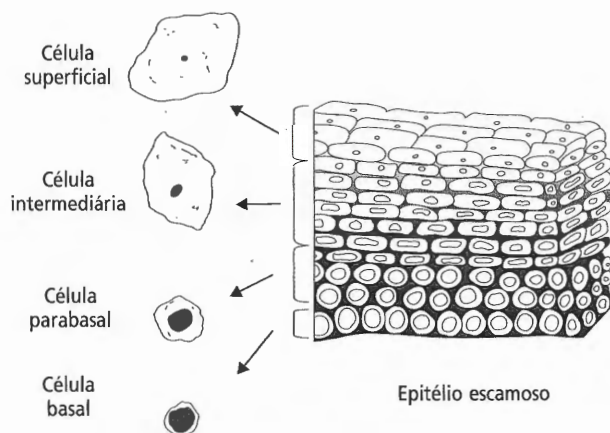



Figura 1.2 – *Epitélio escamoso estratificado não queratinizado.* Representação esquemática do epitélio escamoso estratificado não queratinizado e das células que o constituem.

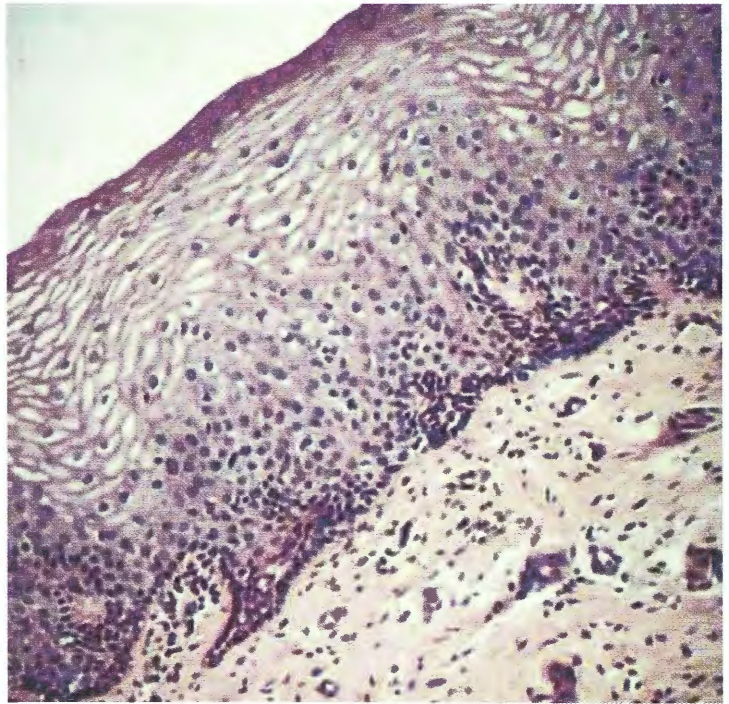
basais levam à formação da camada de células intermediárias, e sua espessura varia de acordo com estímulos hormonais do ciclo menstrual[10]. Pode conter grande quantidade de glicogênio no interior de seu citoplasma, o que indica proliferação e desenvolvimento normal desse epitélio[11]. A camada de células superficiais é a porção mais diferenciada desse epitélio, portanto madura, e que sofre descamação[10]. Abaixo do epitélio escamoso, há uma camada de tecido conjuntivo, vascularizado e com inervação[5]. No período pós-menopausa, esse epitélio sofre um processo de atrofia, tornando-se menos espesso e mais suscetível a infecções e sangramentos[11] (ver detalhes no Capítulo 2).

Epitélio endocervical e endometrial

O canal cervical é revestido por epitélio simples cilíndrico com raras células ciliadas e possui estruturas tubulares secretoras de muco (Figura 1.4)[5]. Sua atividade secretora é regulada pelo estrógeno e atinge sua atividade máxima no momento da ovulação. Essas estruturas glandulares formam-se por invaginações do epitélio cilíndrico. São ainda muito ramificadas, dando origem às criptas endocervicais[11].

O endométrio possui um epitélio de revestimento simples cilíndrico e uma lâmina própria, associado a glândulas endometriais produtoras de muco (Figura 1.5)[5].

978-85-4120-024-0

Figura 1.3 – *Histologia do epitélio escamoso estratificado não queratinizado.* HE 400×. Fotomicrografia cedida pelo Dr. Emerson André Casali, do Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, UFRGS.

JEC e zona de transformação

O local de transição entre os epitélios da porção interna e externa do colo do útero é chamado de JEC (ver Figura 1.1). A localização da JEC em relação ao orifício cervical externo pode variar, dependendo de fatores como idade, estímulo hormonal, uso de anticoncepcionais hormonais e gestação. A JEC original é observada no nascimento e está localizada na junção entre o orifício cervical externo e o epitélio cilíndrico endocervical. Na puberdade, com o crescimento do colo uterino, o canal cervical sofre um alargamento, fazendo com que ocorra a eversão do epitélio endocervical, dando origem ao epitélio ectópico, que se torna mais pronunciado durante a gestação. A exposição desse epitélio ectópico ao meio ácido vaginal leva à substituição por epitélio escamoso do tipo metaplásico. O encontro entre esse novo epitélio metaplásico e o epitélio cilíndrico endocervical ocorre novamente no orifício cervical externo e a JEC passa a ser denominada funcional. Portanto, a região que se estende entre a JEC original e a funcional denomina-se zona de transformação (Figura 1.6)[11,12]. Esse espaço é revestido por epitélio escamoso metaplásico, produtor de glicogênio que se forma a partir da proliferação das células de reserva. As células metaplásicas são cuboides, subcolunares e indiferenciadas, cuja origem não está bem estabelecida, mas se acredita que se formem a partir do epitélio cilíndrico, em resposta ao pH

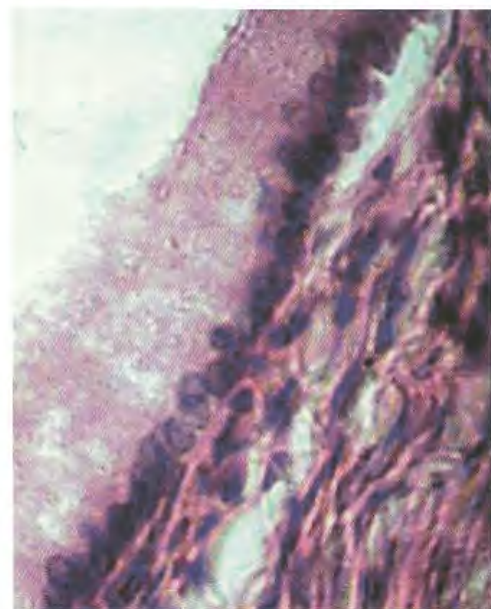



Figura 1.4 – *Histologia do epitélio cilíndrico simples endocervical.* HE 400×. Fotomicrografia cedida pelo Dr. Emerson André Casali, do Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, UFRGS.

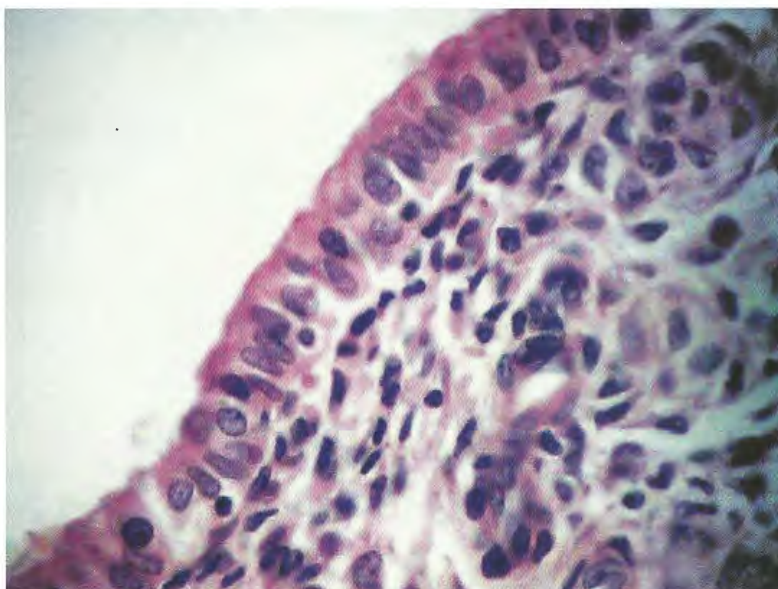



Figura 1.5 – *Histologia do epitélio cilíndrico simples endometrial.* HE 400×. Fotomicrografia cedida pelo Dr. Emerson André Casali, do Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, UFRGS.

ácido vaginal[11] (ver detalhes no Capítulo 5). A identificação da zona de transformação durante a coleta do exame citológico é de grande importância, pois é nessa região que se estabelecem a maioria das lesões precursoras do câncer de colo do útero.

Nas mulheres, principalmente após a menopausa, o colo do útero diminui de tamanho, por ausência de estímulo hormonal, ocorrendo deslocamento da JEC para dentro do canal endocervical.

Tubas uterinas

Anatomia

As tubas uterinas são dois ductos que se estendem bilateralmente a partir do útero, abrem-se na cavidade peritoneal próximo aos ovários e se situam na margem superior do ligamento largo. Dividem-se em quatro partes: o infundíbulo, extremidade lateral que apresenta formato de funil – a margem livre deste se divide em processos

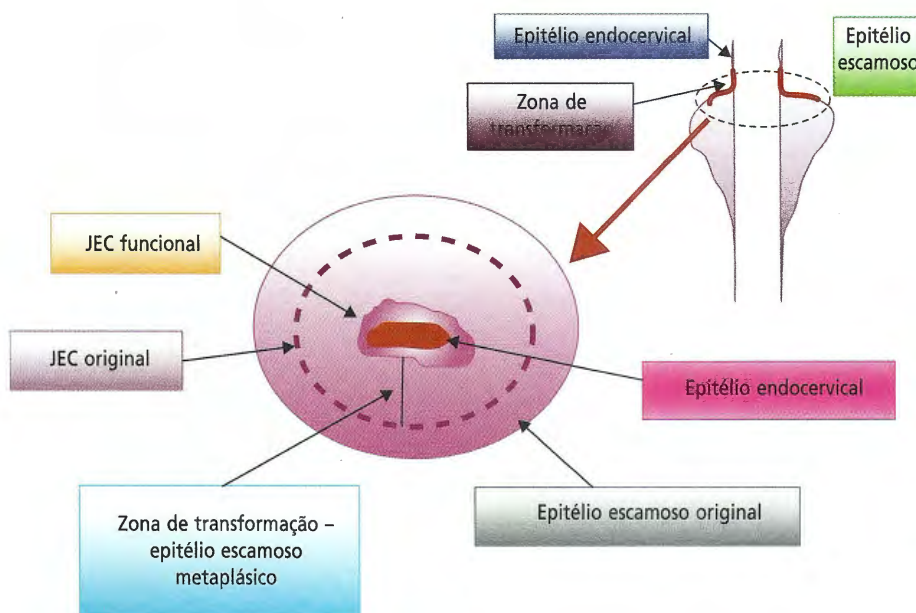



Figura 1.6 – *Zona de transformação.* Esquema representando a localização da zona de transformação. Figura cedida pela Profa. Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá, PR.

978-85-4120-024-0

digitiformes, as fímbrias, que se espalham sobre os ovários (ver Figura 1.1). A ampola é a porção mais larga e longa das tubas uterinas. Nesse local, normalmente ocorre a fertilização dos ovócitos liberados dos ovários. O istmo, porção mais estreita das tubas, está situado lateralmente ao útero. O segmento intramural é a porção que atravessa a parede do útero. O suprimento arterial das tubas uterinas é proveniente das artérias uterinas e ováricas. As veias tubárias drenam para as veias ováricas e para o plexo venoso uterino; os vasos linfáticos, para os linfonodos lombares[6].

Histologia

A parede das tubas é formada por uma camada mucosa, sustentada pela lâmina própria, uma camada muscular e uma camada serosa. O epitélio de revestimento das tubas uterinas é cilíndrico, simples, com células ciliadas e secretoras, que respondem ao controle hormonal. A presença dos cílios, juntamente com os movimentos peristálticos das tubas uterinas, auxilia no impulso do ovócito em direção ao útero[5].

Ovários

Anatomia

Os ovários são órgãos em formato de amêndoas e localizam-se um de cada lado do útero, na cavidade pélvica entre a bexiga e o reto. Fixam-se pelo mesovário à face posterior do ligamento largo do útero, porém não são revestidos pelo peritônio. Por estarem fixados à face posterior do ligamento largo do útero, os ovários acompanham o útero na gravidez. O suprimento sanguíneo nos ovários é constituído pela artéria ovárica. As veias ováricas drenam para a veia cava inferior, no lado direito, e para a veia renal esquerda, no lado esquerdo. A drenagem linfática segue os vasos sanguíneos ováricos, à medida que sobem em direção aos linfonodos lombares[8]. A inervação desce ao longo dos vasos ováricos, a partir do plexo ovárico, que se comunica com o plexo uterino[6].

São órgãos que apresentam aspecto liso e rosado antes da puberdade; mas, após a primeira ovulação, tornam-se branco-acinzentados e rugosos, em decorrência das cicatrizes produzidas pelas ovulações. Os ovários também tendem a se contrair após a menopausa e sua face torna-se coberta por cicatrizes[8].

Histologia

O revestimento dos ovários é formado por epitélio cúbico, mas, em algumas áreas, é pavimentoso simples, e por uma camada subjacente de tecido conjuntivo, denominada túnica albugínea. São formados pelo córtex externo, que contém tecido conjuntivo e folículos primordiais, e pela medula central, que consiste em tecido conjuntivo que sustenta os vasos sanguíneos, linfáticos e nervos[9]. Produzem estrógeno e progesterona, que, por sua vez, controlam o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários e atuam sobre o útero nos mecanismos de implantação do óvulo fecundado e início do desenvolvimento do embrião (ver detalhes no Capítulo 2).

CITOLOGIA NORMAL DO TRATO GENITAL FEMININO

O princípio básico da citologia é identificar as alterações na morfologia celular, observando-se o citoplasma e o núcleo das células coradas pela técnica de Papanicolaou. As características citoplasmáticas indicam o grau de diferenciação celular, que, quando se alteram, podem mostrar diferenças em sua quantidade e forma, coloração, apresentar vacuolizações, depósito anormal de proteínas como a queratina, entre outras. O núcleo, por sua vez, quando se analisam o aspecto, a coloração, o tamanho e a forma da membrana nuclear, indica se a célula está normal, saudável ou se está sofrendo alterações inflamatórias, pré-neoplásicas e até mesmo neoplásicas. A seguir, serão descritas as principais células e os demais componentes que podem ser observados em um esfregaço citopatológico cérvico-vaginal, no seu padrão de normalidade.

Células do epitélio escamoso

Na idade reprodutiva, sob estimulação hormonal, o epitélio escamoso sofre maturação completa e descamação celular. As células que compõem esse epitélio têm sua classificação baseada na origem histológica e são compostas de *células basais*, *parabasais*, *intermediárias* e *superficiais* (ver Figura 1.2). Desde a camada profunda até a superfície do epitélio, o processo de maturação dessas células leva a uma alteração na sua morfologia, com aumento no tamanho da célula e redução do volume nuclear. Na camada mais profunda desse epitélio, estão as *células basais*, que são basófilas, pequenas, têm forma redonda e apresentam núcleo volumoso e central. São células que sofrem mitose e mantêm a renovação do epitélio escamoso, por sua capacidade de sofrerem mitose. Dificilmente sofrem descamação, entretanto podem aparecer no esfregaço citológico, principalmente após o parto, por diminuição hormonal brusca, que leva à descamação intensa, e também em casos de atrofia grave (ver detalhes no Capítulo 2). As *células parabasais* (Figura 1.7) são maiores, apresentam-se arredondadas, com citoplasma mais abundante que as basais, e bordas bem-delimitadas, sendo o citoplasma basófilo, denso e de coloração azul-esverdeada, mas também podem ser observadas células coradas de cinza, rosa e mais raramente laranja. São verificadas, principalmente, em esfregaços atróficos, quando o epitélio encontra-se pouco diferenciado, como no pós-parto, na pós-menopausa e na infância. Em estados atróficos mais pronunciados, como observado após alguns anos de menopausa, essas células podem apresentar características de degeneração, como picnose e cariorrexe, levando à fragmentação do conteúdo celular (ver detalhes no Capítulo 5). As células *intermediárias* têm forma poligonal, citoplasma abundante e normalmente cianófilo (Figura 1.8). O núcleo apresenta forma arredondada e cromatina finamente granular. Possuem alto teor de glicogênio e descamam em aglomerados celulares por conta da presença de desmossomos. Os lactobacilos que compõem a flora normal da vagina metabolizam o glicogênio presente nessas células a ácido láctico, que mantém o pH ácido vaginal. A ação dessas bactérias sobre as células intermediárias leva à degradação citoplasmática com o aparecimento de núcleos desnudos no esfregaço, um processo denominado citólise. Durante a gravidez, pelo alto teor de glicogênio, essas células adquirem um formato navicular, ocorrendo arredondamento da borda citoplasmática e deslocamento do núcleo para a periferia. As células mais diferenciadas do epitélio escamoso são as *superficiais*

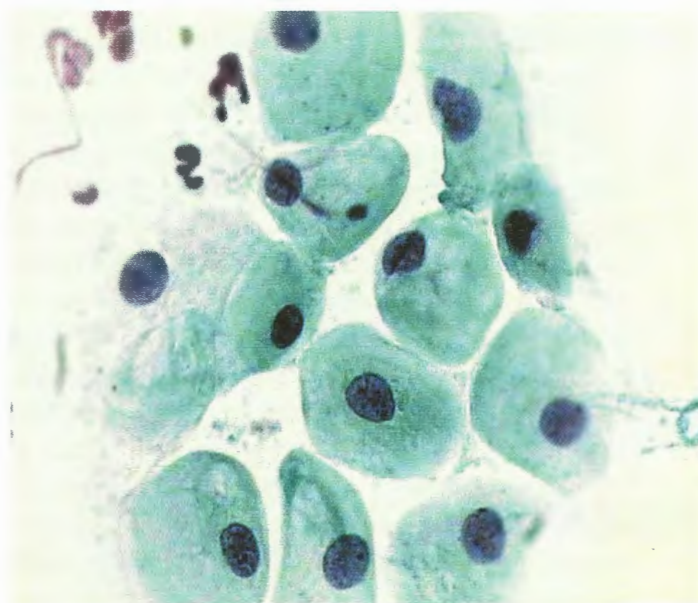



Figura 1.7 – *Células parabasais*. Essas células apresentam margens redondas e citoplasma denso e fracamente basofílico. Papanicolaou 400×. Fotomicrografia do Atlas Digital de Citologia Cérvico-vaginal cedida pela Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá, PR.

(Figura 1.9). Por serem destituídas de junções celulares, descamam facilmente e de forma isolada. Apresentam citoplasma abundante, poligonal, de aspecto delicado, transparente e rico em pré-queratina. De acordo com sua afinidade por corantes da técnica de Papanicolaou, podem ser cianófilas ou eosinófilas. O núcleo é pequeno, denso, central e picnótico[10].

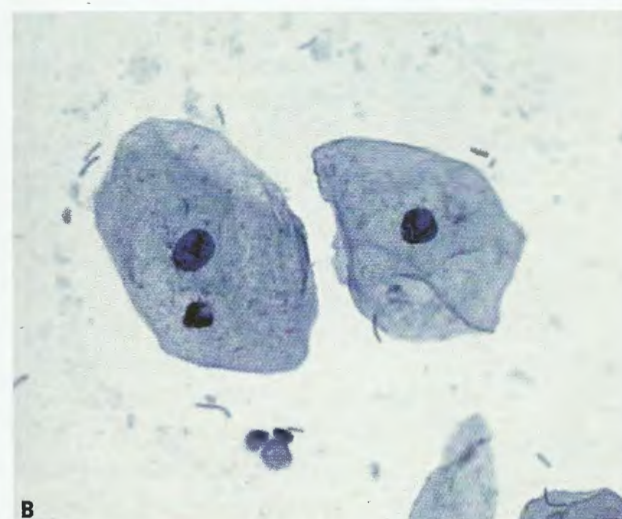
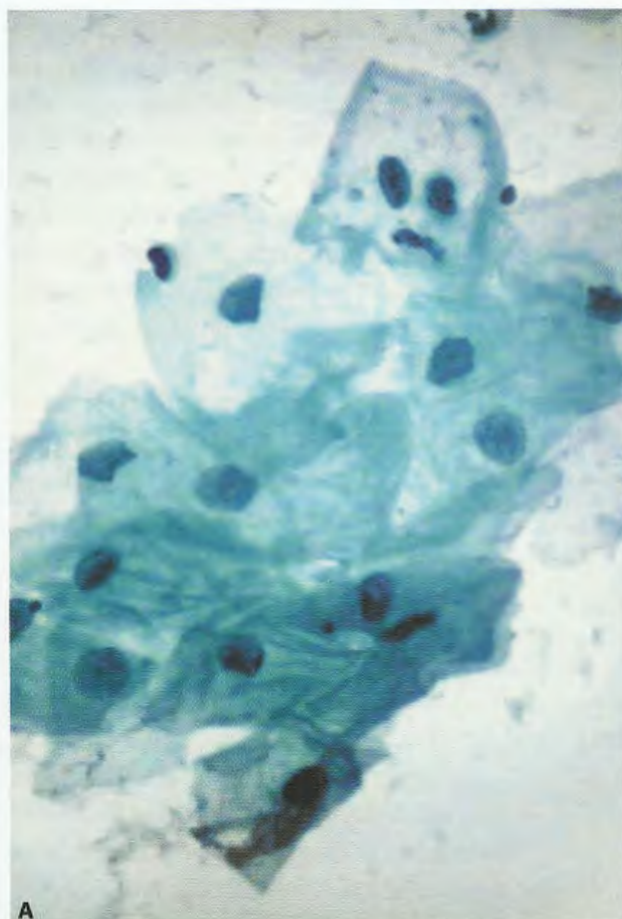



Figura 1.8 – *Células intermediárias.* (*A*) Nesse campo, há células intermediárias poligonais com núcleos vesiculares e citoplasma cianófilo e alguns lactobacilos ao fundo. (*B*) As duas células intermediárias apresentadas nesse campo estão acompanhadas de alguns lactobacilos. Papanicolaou 400×. Fotomicrografia do Atlas Digital de Citologia Cérvico-vaginal cedida pela Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá, PR.

Figura 1.9 – *Células superficiais.* Nos campos *A* e *B*, essas células apresentam núcleo picnótico, denso e citoplasma abundante. Em *A*, duas células apresentam citoplasma eosinófilo e uma apresenta citoplasma basófilo. Em *B*, o grupamento de células superficiais apresenta citoplasma eosinófilo. Papanicolaou 400×. Fotomicrografia (*A*) do Atlas Digital de Citologia Cérvico-vaginal cedida pela Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá, PR.

Células endocervicais

O epitélio cilíndrico simples que reveste a endocérvice é constituído por células produtoras de muco e células ciliadas. As células *endocervicais* (Figura 1.10), também denominadas células glandulares, são altas, possuem núcleo redondo ou oval, volumoso, excêntrico e com cromatina finamente granular. São células bastante sensíveis a alterações reativas e, por essa razão, o núcleo, que é normalmente único, pode ser multinucleado nessas situações. O citoplasma apresenta-se basófilo, delicado e vacuolizado. Normalmente descamam em agrupamentos de células, que podem ter disposição em "favo de mel", quando vistas de cima, e em "paliçada", quando vistas lateralmente[10].

A presença dessas células no esfregaço cérvico-vaginal é um importante indicativo da qualidade dele, pois demonstra que a coleta foi realizada na JEC (ver detalhes no Capítulo 3).

Células endometriais

A descamação do epitélio glandular do endométrio durante a menstruação permite a observação das células endometriais nos esfregaços cérvico-vaginais, que podem aparecer até o décimo segundo dia do ciclo menstrual. As células *endometriais* são pequenas, descamam em agrupamentos celulares densos, tridimensionais e de duplo contorno, mas também podem ser vistas isoladas (Figura 1.11, *A*). Possuem tamanho e volume nuclear menores do que as células endocervicais, além de terem pouca definição das bordas citoplasmáticas. Podem ser ciliadas ou não ciliadas e, com frequência, aparecerem degeneradas. O núcleo é arredondado ou oval, pequeno, excêntrico e hipercromático. As células do estroma também podem ser observadas acompanhando as células endometriais. Durante o fluxo menstrual, a descamação intensa das células endometriais, epiteliais e do estroma, que pode conter também histiócitos, forma aglomerados tridimensionais denominados êxodo (Figura 1.11, *B*)[10].

A visualização de células endometriais após os 12 primeiros dias do ciclo menstrual em esfregaços cérvico-vaginais é considerada anormal e adquire maior importância em mulheres na pós-menopausa. A presença de células endometriais predominantemente ciliadas pode indicar processo de metaplasia tubária, que é a representação de epitélio semelhante ao da tuba uterina na superfície do endométrio ou do canal endocervical[13]. Essa alteração é associada a condições hipoestrogênicas, sendo mais frequente em mulheres após conização e histerectomia[14]. Além disso, sua presença nos esfregaços cérvi-

978-85-4120-024-0

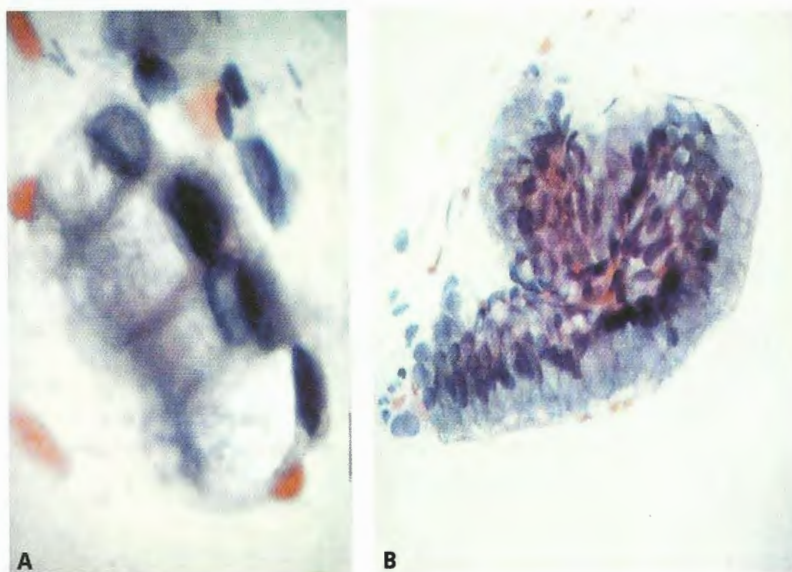



Figura 1.10 – *Células endocervicais.* Fotomicrografia de células distendidas pelo muco presente no citoplasma, em maior aumento (*A*), e um folheto de células endocervicais com arranjo em "paliçada" (*B*). Papanicolaou (*A*) 1.000× e (*B*) 200×.

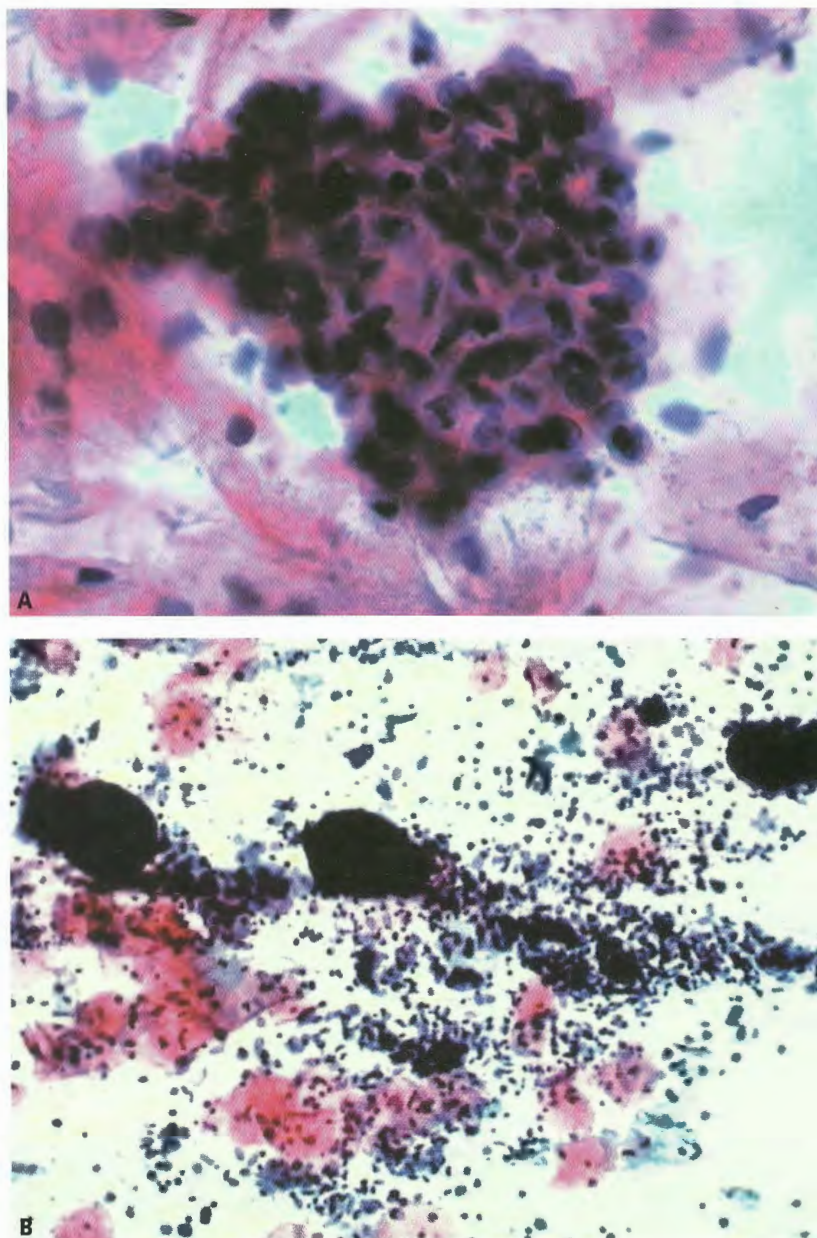



Figura 1.11 – *Células endometriais.* Grupo de células endometriais (*A*) e êxodo menstrual (*B*), que apresenta histiócitos e detritos que acompanham os grupos de células endometriais em esfregaços menstruais. Papanicolaou (*A*) 100× e (*B*) 400×. Fotomicrografias do Atlas Digital de Citologia Cérvico-vaginal cedida pela Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá, PR.

co-vaginais é passível de confusão, podendo levar a diagnósticos falso-positivos, principalmente de neoplasias glandulares, por conta das semelhanças morfológicas de seus grupamentos.

Outras estruturas

A presença de leucócitos, principalmente de *neutrófilos* segmentados, desde que em pequeno número, constitui um achado frequente nos esfregaços cérvico-vaginais, e suas quantidades variam de acordo com o período do ciclo menstrual (Figura 1.12). São escassos durante a ovulação e um pouco mais numerosos na fase progestacional. Entretanto, quando presentes em grandes quantidades, normalmente estão associados a processos inflamatórios. Nessas condições, obscurecem e dificultam a visualização dos demais componentes celulares do esfregaço. Os *linfócitos* são bem menos frequentes nos esfregaços cervicais. Muitas vezes podem ser observadas quantidades expressivas dessas células relacionadas com infecções crônicas, como

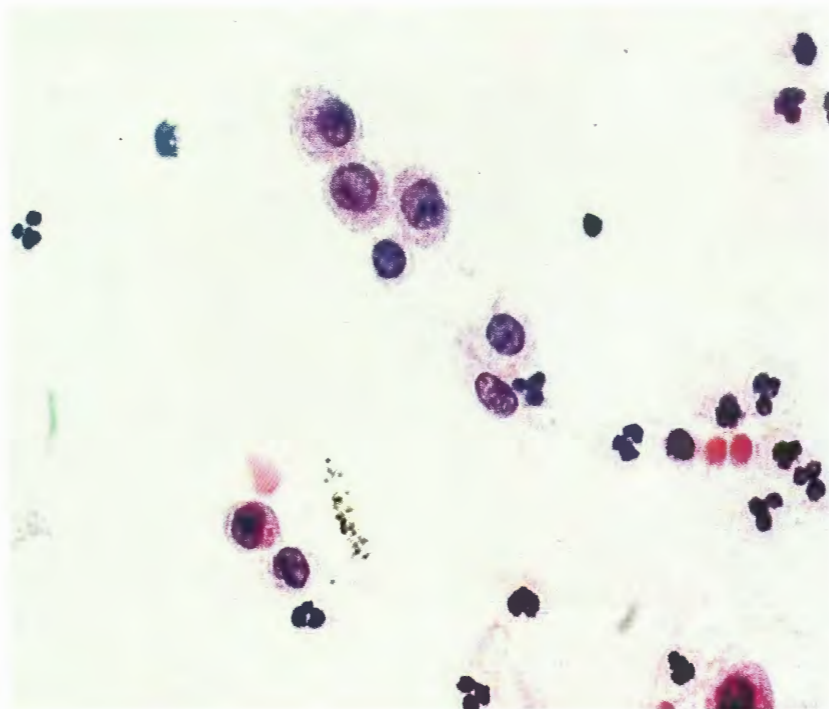



Figura 1.12 – *Neutrófilos e histiócitos.* Presença de alguns histiócitos mononucleados, neutrófilos e também algumas hemácias. Papanicolaou 400×. Fotomicrografia do Atlas Digital de Citologia Cérvico-vaginal cedida pela Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá, PR.

nos casos de cervicite folicular. As *hemácias* aparecem de forma predominante nos esfregaços durante o período menstrual. Por essa razão, não é recomendada a realização de coleta de material cérvico-vaginal para citologia nesse período (Figura 1.12). Sua presença pode ainda estar relacionada com ulcerações e traumas durante a coleta, bem como a casos de câncer cervical.

Bastante comuns nos esfregaços, os *histiócitos* são células que apresentam formas variadas, mas geralmente apresentam núcleo em forma de "grão de feijão" ou reniforme e citoplasma vacuolizado e cianófilo (Figuras 1.12 e 1.13). Podem ser numerosos em esfregaços atróficos, onde se apresentam também como células gigantes e multinucleadas (Figura 1.13, *A*). Grandes quan-

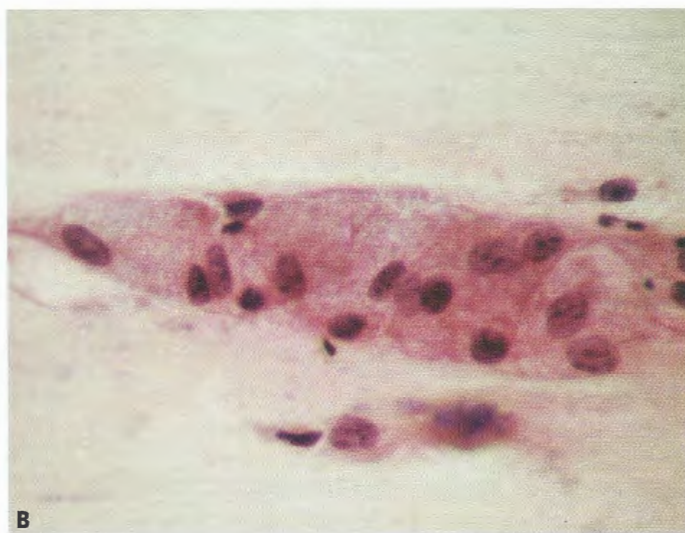
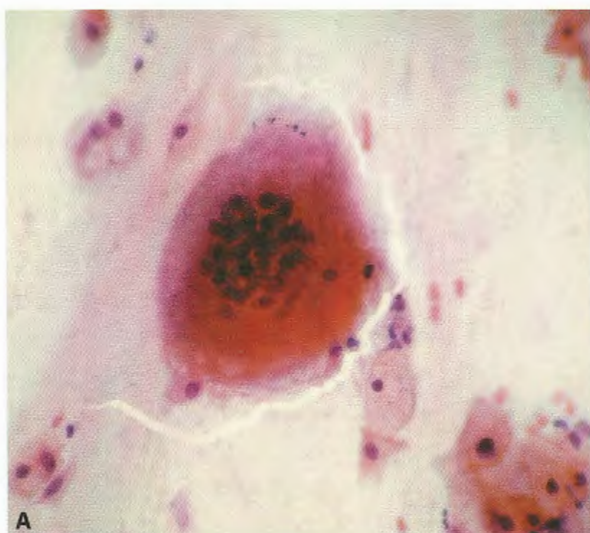



Figura 1.13 – *Histiócitos.* Fotomicrografia de um histiócito gigante multinucleado (*A*) e um grupo de histiócitos menores (*B*). Papanicolaou 400×.

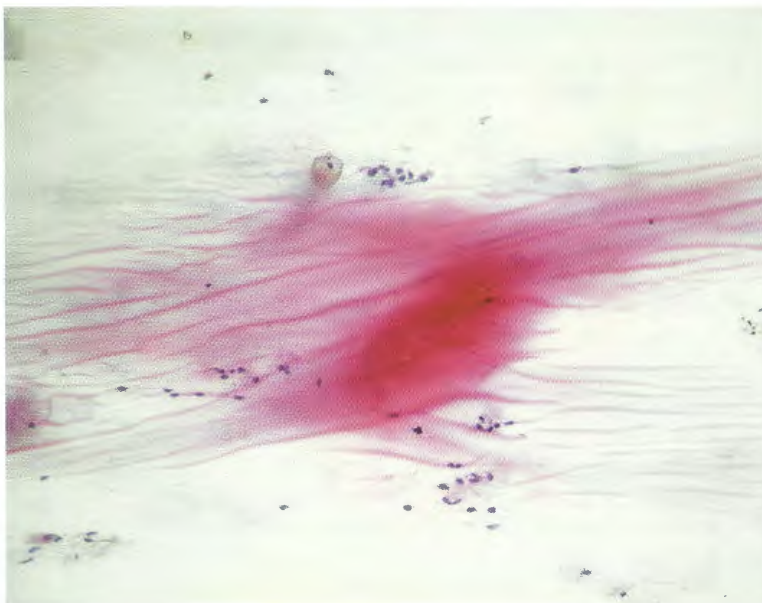



Figura 1.14 – *Muco*. Fotomicrografia de campo com a presença de muco, produzido pelas células endocervicais. Papanicolaou 100×.

tidades dessas células podem acompanhar também doenças endometriais, como nos casos de hiperplasia glandular e adenocarcinoma.

A presença de *muco*, secretado pelas células endocervicais, pode ser observada nos esfregaços, entretanto não apresenta significado clínico importante no exame de Papanicolaou (Figura 1.14).

Os *espermatozoides* também podem ser verificados nos esfregaços cérvico-vaginais. Muitas vezes não apresentam cauda, o que pode ser confundido com leveduras de *Candida* spp.

A flora vaginal predominante em condições de normalidade em idade reprodutiva é representada pelos *lactobacilos* ou bacilos de Döderlein. Essas bactérias são bacilos gram-positivos grandes, que se coram em azul pela técnica de Papanicolaou (Figura 1.15). Alimentam-se do glicogênio presente nas células intermediárias, auxiliando, dessa forma, na manutenção do pH ácido vaginal, conforme já discutido anteriormente neste mesmo capítulo, nas células do epitélio escamoso (ver detalhes no Capítulo 6).

978-85-4120-024-0

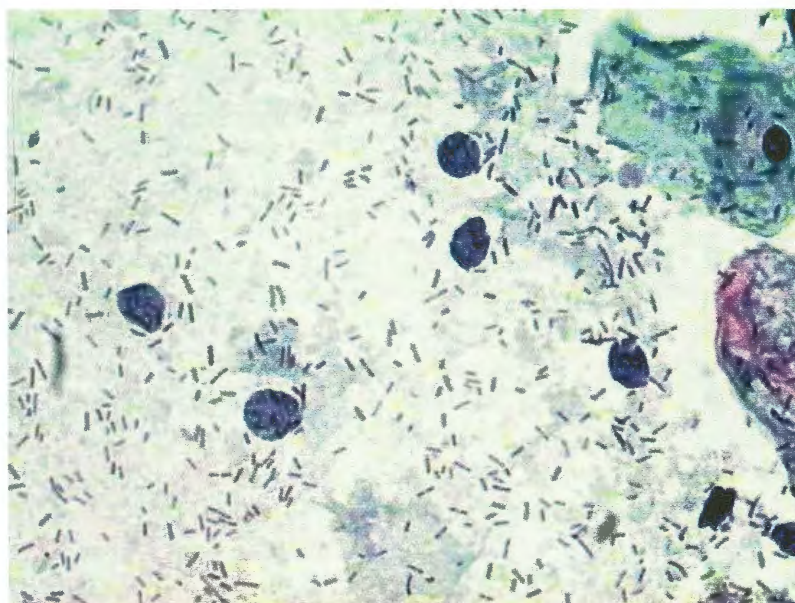



Figura 1.15 – *Lactobacilos*. Grande quantidade de lactobacilos no esfregaço, alguns núcleos soltos e restos citoplasmáticos, característicos de citólise. Papanicolaou 400×. Fotomicrografia do Atlas Digital de Citologia Cérvico-vaginal cedida pela Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá, PR.

Referências

1. DONNÉ, A. Cours de microscopie complementaire des etudes medicales. **Bailliere Et Filís**. Paris, 1845.
2. POUCHET, F. A. **Theorie Positive de l'ovulation Spontanee et de la Fecondation des Mammiferes et de l'espece Humaine, Basee sur l'observation de Taute la Serie Animale.** Paris: J. B. Bailliere, 1847.
3. PAPANICOLAOU, G. N. **New Cancer Diagnosis**. Proceedings of the Third Race Betterment Conference. Battle Creek, Michigan: Race Betterment Foundation, 1928. p. 528-534.
4. BABES, A. Diagnostic du Cancer du Col Utérin par les Frottis. **La Presse Medicale**, v. 36, p. 451-454, 1928.
5. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica:** texto e atlas. 11. ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. p. 524.
6. MOORE, K. L.; DALEY, A. F. **Anatomia Orientada para a Clínica**. 5. ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2007. p. 1101.
7. WILLIAMS, P. L.; WARWICK, R.; DYSON, M. et al. **Gray Anatomia**. 37. ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, v. 2, 1995. p. 1489.
8. SNELL, R. S. **Anatomia Clínica para Estudantes de Medicina**. 5. ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999. p. 857.
9. KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular:** uma introdução à patologia. 2. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 677.
10. DEMAY, R. M. The Pap smear. In: DEMAY, R. M. **The Art & Science of Cytopathology**. Chicago: ASCP Press, 1996, p. 61-205. Cap. 6.
11. SELLORS, J.; SANKARANARAYANAN, R. **Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia:** a beginners' manual. Lyon: IARC Press, 2003. p. 132.
12. TATTI, S. **Colposcopia e Patologias do Trato Genital Inferior:** vacinação contra o HPV. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 367.
13. GAUR, D. S.; KISHORE, S.; KUSUM, A. et al. Tubal metaplasia of the endocervix. **J. Cytol.**, v. 25, p. 33-35, 2008.
14. DUCATMAN, B. S.; WANG, H. H.; JONASSON, J. G. et al. Tubal metaplasia: a cytologic study with comparison to other neoplastic and non-neoplastic conditions of the endocervix. **Diagnostic Cytopathology**, v. 9, p. 98-103, 1993.

Bibliografia complementar

SOLOMON, D.; DAVEY, D. ; KURMAN, R. et al. The 2001 Bethesda system. Terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**, v. 287, p. 2114-2119, 2002.

SOLOMON, D.; NAYAR, R. **The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology:** definitions, criteria, and explanatory notes. 2. ed., New York: Springer-Verlag, 2004. p. 193.

Capítulo 2

Citologia Hormonal

Márcia Edilaine Lopes Consolaro
Mariana Clivati Silva
Vânia Ramos Sela da Silva

INTRODUÇÃO

Histórico e fundamento da citologia hormonal

A citologia diagnóstica, como nós conhecemos atualmente, iniciou-se de uma investigação das mudanças hormonais do epitélio vaginal durante o ciclo menstrual, realizada por Stockard e Papanicolaou (1917), que acidentalmente descobriram células cancerosas[1]. A citologia hormonal é definida como a avaliação das condições endócrinas das pacientes por meio do estudo morfológico das células vaginais, sendo uma das primeiras aplicações diagnósticas da citologia clínica[1-3]. Os primeiros estudos sobre citologia hormonal tiveram início em 1847, quando Pouchet publicou um atlas descrevendo as alterações morfológicas das células vaginais que ocorrem durante o ciclo ovárico. Papanicolaou (1928) e Babes (1928), de modo independente, publicaram um método baseado em esfregaços vaginais para detectar o câncer cervical. Nos anos seguintes, Papanicolaou e colaboradores publicaram monografias sobre a utilização de esfregaços citológicos para detecção e diagnóstico de lesões uterinas (1943 a 1948), tornando a citologia diagnóstica um método bem estabelecido. Como consequência, a citologia hormonal também se tornou amplamente divulgada e utilizada, com aumento significativo no número de trabalhos na literatura sobre metodologia, resultados e eficiência desta técnica[1,3].

A citologia hormonal, apesar de certas limitações, é eficiente, não dispendiosa e rápida para estabelecer as condições hormonais de uma paciente[1-3]. Atualmente a avaliação das funções

ováricas e de distúrbios endócrinos femininos é realizada, principalmente, por diferentes métodos e análises bioquímicas, como de estrógeno, progesterona, hormônios luteinizantes e seus metabólitos. Essas análises são extremamente precisas e rápidas. A citologia hormonal tornou-se mais utilizada quando não existem laboratórios especializados nessas análises bioquímicas[1] ou na escassez de recursos financeiros para adotá-las.

A citologia hormonal fundamenta-se no fato de o epitélio estratificado escamoso não queratinizado ser provido de receptores hormonais que controlam a maturação e a diferenciação celulares. Assim, o epitélio vaginal sofre uma série de modificações cíclicas dependentes fundamentalmente da secreção dos hormônios ováricos estrógeno e progesterona. O estrógeno induz a maturação epitelial completa e leva à predominância de células escamosas superficiais maduras no esfregaço citológico. A progesterona produz efeitos contrários aos do estrógeno e inibe o processo de maturação. A ausência de estrógenos e hormônios relacionados ocasiona a redução acentuada do nível de maturação do epitélio escamoso (atrofia). Por esse motivo, o estudo da maturação escamosa vaginal dá informações sobre as taxas do estrógeno e dos outros hormônios esteroides.

Aplicações da citologia hormonal

Além de estabelecer a condição hormonal da paciente, é válido, ainda, para avaliar a função ovárica normal e patológica da puberdade até a menopausa, estimar o tempo da ovulação, avaliar a função placentária e disfunções em obstetrícia, auxiliar na seleção da terapia hormonal e acompanhar os resultados de tratamentos hormonais[3]. Ainda, quando há suspeita clínica de determinadas anormalidades congênitas, pode ser analisada a cromatina sexual (corpos sexuais cromatínicos) no mesmo esfregaço da citologia hormonal[1].

Regras a serem observadas para avaliação citológica hormonal

A maneira mais segura para determinar as mudanças hormonais cíclicas é realizá-la em esfregaço obtido por escarificação da parede lateral da vagina, que é mais sensível à ação hormonal, a certa distância da cérvice uterina. Algumas informações sobre o estado hormonal da mulher, porém, podem ser obtidas por avaliação dos esfregaços cervicais de rotina[1]. A coleta no fundo de saco vaginal posterior deve ser evitada, pois, nesse local, pode haver produtos de descamação da cérvice uterina, células inflamatórias e detritos, que dificultariam a avaliação. Não é possível realizar a avaliação hormonal na presença de processos inflamatórios, tratamentos hormonais, citólise, câncer, irradiações, cirurgias recentes ou outros procedimentos como cauterizações[1], pois essas condições invalidam a análise por conta de mudanças no padrão morfológico e tintorial das células escamosas.

Outras regras devem ainda ser observadas para que os resultados obtidos com a citologia hormonal sejam confiáveis. Coletas repetidas devem ser realizadas e comparadas no mesmo ciclo ou no decurso de um tratamento hormonal. O citologista também deve ser informado sobre dados clínicos da paciente, como idade, dia do ciclo menstrual, situações fisiológicas ou patológicas do aparelho genital e utilização de tratamento hormonal, pois não há interpretação hormonal válida sem essas informações.

CICLO SEXUAL OU MENSTRUAL MENSAL

Ciclo sexual mensal ou ciclo menstrual é definido como as alterações mensais nas taxas de secreção dos hormônios femininos, que promovem mudanças nos ovários e em outros órgãos sexuais, durante os anos reprodutivos normais[4].

É um processo regulado primeiramente por células nervosas do hipotálamo, mediante a secreção do GnRH; em seguida, pela hipófise anterior, que secreta os hormônios FSH e LH; e, por fim, pelos ovários, pela secreção dos hormônios estrógeno e progesterona (Figura 2.1)[4].

O objetivo final do ciclo sexual mensal da mulher é preparar o endométrio para uma possível gravidez[5].

978-85-4120-024-0

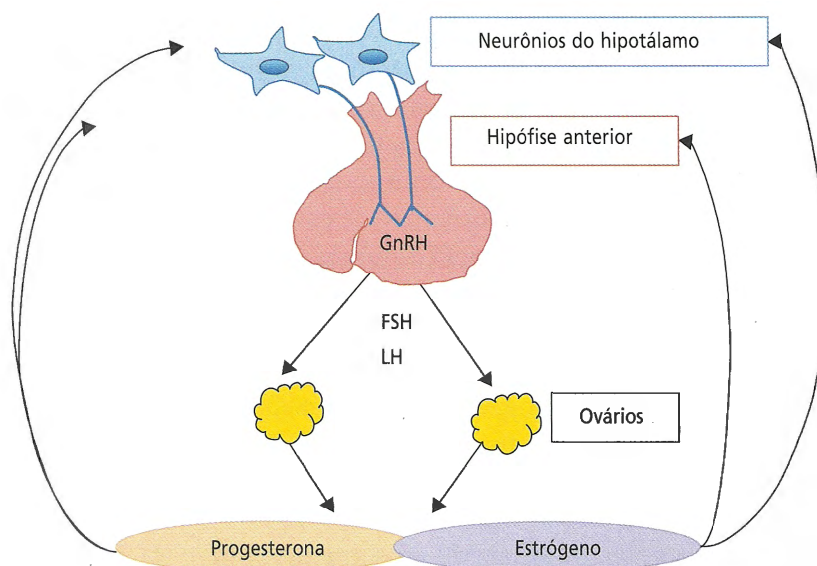



Figura 2.1 – Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-ovárico.

Alterações hormonais

O GnRH, liberado por neurônios hipotalâmicos, é o principal mediador do processo reprodutivo. Atua sobre a hipófise anterior, onde age sobre receptores específicos da membrana de células produtoras de dois hormônios gonadotróficos – o LH e o FSH –, promovendo sua liberação na circulação sistêmica, de modo que alcancem os ovários[4,6].

O ovário é o órgão central do sistema reprodutor feminino, divido em duas regiões principais: medular e cortical. Nessa última, estão localizados os folículos ováricos em vários estágios de desenvolvimento. Os ovários têm duas funções principais: a produção das células reprodutoras ou gametas (ovócitos) e a secreção de hormônios esteroides[7]. FSH e LH agem sobre os ovários, estimulando o crescimento e a proliferação das células, bem como aumentando as taxas de secreção dos hormônios. Os hormônios ováricos mais diretamente responsáveis pelo ciclo menstrual são o estrógeno e a progesterona[1]. O FSH e o LH ligam-se aos receptores de membrana das células ováricas, estimulando o aumento da atividade da adenilato ciclase, que, por sua vez, estimula a síntese do cAMP a partir da ATP. O cAMP ativa uma proteinoquinase, ocasionando a formação da colesterol esterase e de outras enzimas envolvidas na biossíntese dos hormônios esteroides. A colesterol esterase provoca o acúmulo de colesterol livre, que é transformado por enzimas em hormônios esteroides no retículo endoplasmático liso das células ováricas. Esses hormônios interagem com células do endométrio, músculo liso do útero, epitélio escamoso da cérvice e, principalmente, vagina[1].

Na infância, os ovários permanecem inativos, pois o centro hipotalâmico está bloqueado até a puberdade, quando ocorre sua liberação por motivos ainda não totalmente estabelecidos, podendo estar relacionada com a participação de fatores ambientais, opioides endógenos, peso corporal ou quantidade de gordura corporal, entre outros[8].

Entre 9 e 12 anos de idade, a hipófise começa a secretar progressivamente mais FSH e LH, levando ao início dos ciclos sexuais mensais, que começam entre 11 e 15 anos. O primeiro ciclo menstrual é denominado menarca.

A Figura 2.2 mostra as alterações hormonais em cada ciclo sexual mensal de 28 dias, tendo início quando as concentrações de FSH e LH aumentam, sendo o aumento do FSH ligeiramente maior que o do LH. Esses hormônios, em especial o FSH, causam crescimento acelerado de 6 a 12 folículos primários por mês. No início, ocorre proliferação rápida das células da granulosa. Em seguida, surge uma segunda massa de células denominadas teca, que se divide em teca

interna e externa. Na teca interna, as células desenvolvem a capacidade de secretar os hormônios estrógeno e progesterona. A teca externa desenvolve-se em uma cápsula de tecido conjuntivo vascular, que se torna a cápsula do folículo em desenvolvimento.

O estrógeno secretado pelo folículo faz que as células da granulosa formem quantidades cada vez maiores de receptores de FSH, levando ao *feedback* positivo, em que as células ficam ainda mais sensíveis ao FSH. Este e estrógeno juntos promovem aumento dos receptores de LH nessas células, permitindo sua estimulação e gerando o aumento na secreção folicular.

Após 1 semana ou mais de crescimento, um dos folículos começa a crescer mais do que os outros, que, por sua vez, involuem. Esse processo é importante para que apenas um folículo cresça o suficiente até a ovulação, que ocorre após 14 dias do início da menstruação, em mulheres com ciclo sexual de 28 dias.

Aproximadamente 2 dias antes da ovulação, a taxa de secreção de LH pela hipófise anterior aumenta muito, alcançando um pico em torno de 16 h anteriores ao fenômeno. Esse aumento é essencial para que a ovulação ocorra.

Sob influência do LH, após a ovulação, as células da granulosa e tecais internas remanescentes alteram-se para células luteínicas, e a massa total é denominada corpo lúteo, que é altamente secretor, produzindo grandes quantidades de progesterona e menores de estrógeno.

Os hormônios, agora secretados pelo corpo lúteo, têm efeitos de *feedback* negativos potentes da hipófise anterior e em menor proporção sobre o hipotálamo, mantendo reduzidas as taxas de secreção de FSH e LH, que fazem com que o corpo lúteo degenere ou involua.

Se não houver fecundação, a involução do corpo lúteo se dá aproximadamente 2 dias antes da menstruação. Nesse período, a parada de secreção hormonal pelo corpo lúteo faz com que

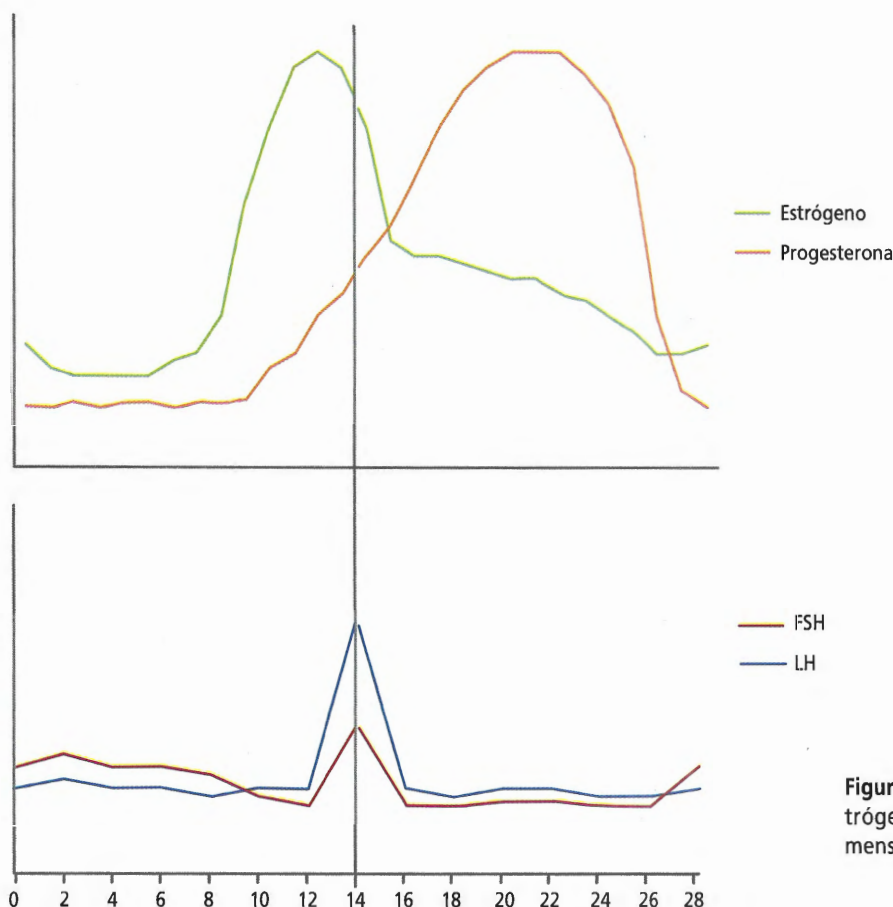



Figura 2.2 – Alterações cíclicas de FSH, LH, estrógeno e progesterona em um ciclo sexual mensal de 28 dias.

978-85-4120-024-0

haja remoção da inibição por *feedback* negativo na hipófise anterior, que volta a secretar FSH e LH, dando início a um novo ciclo sexual[4].

Quando ocorre a gravidez, a placenta secreta grande quantidade de hCG, somatomamotrofina coriônica humana, estrógeno e progesterona.

A hCG tem como função evitar a involução do corpo lúteo, de modo que a secreção de estrógeno e progesterona continue pelos próximos meses, impedindo a menstruação e fazendo que o endométrio continue a crescer e a armazenar grandes quantidades de nutrientes. Após algumas semanas, a placenta secreta quantidades suficientes de progesterona e estrogênios para manter a gravidez até o fim do período gestacional e o corpo lúteo involui lentamente.

Após o parto, na maioria das mães que estão amamentando, sinais neuronais que chegam ao hipotálamo, promovendo a secreção de prolactina, atuam sobre a liberação de GnRH, suprimindo a formação do FSH e LH, de modo que o ciclo sexual mensal não retorna até que a frequência da amamentação diminua ou pare por completo e a hipófise volte a secretar os hormônios gonadotróficos[4].

Alguns fatores fisiológicos, iatrogênicos ou patológicos podem influenciar no funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-ovárico, por exemplo, estresse, exercícios físicos acentuados, alterações na função da tireoide, uso de drogas ou medicamentos, anorexia, traumatismos, tumores, hiperprolactinemia, determinadas doenças crônicas, entre outros[8].

Hormônios ováricos

Como dito anteriormente, sob estímulo do GnRH liberado pelo hipotálamo, a hipófise anterior secreta os hormônios FSH e LH, que estimulam a produção de estrógeno e progesterona pelos ovários, que, por sua vez, são responsáveis pelo desenvolvimento sexual feminino e pelas alterações sexuais mensais[6].

O estrógeno é responsável pela maturação e pela proliferação do epitélio vaginal. Ele confere: maior resistência a traumas e infecções; proliferação da mucosa da endocérvice e endométrio; aumento do volume de água do muco cervical e proliferação e crescimento de células específicas do corpo, responsáveis pelo desenvolvimento da maioria das características sexuais da mulher, como de células musculares lisas do útero, crescimento das mamas e deposição de tecido adiposo em coxas e quadris.

O estrógeno inibe a atividade osteoclástica nos ossos e, portanto, estimula o crescimento ósseo. Na menopausa, quase nenhum estrógeno é secretado pelos ovários, ocasionando maior atividade osteoclástica, diminuição da matriz óssea e menos depósito de cálcio e fosfato ósseos. Em alguns casos, pode resultar em osteoporose.

A progesterona atua basicamente preparando o útero para a gravidez e as mamas para a lactação. Sua função mais importante é promover mudanças secretórias no endométrio uterino durante a última metade do ciclo sexual feminino, preparando o útero para a implantação do óvulo fertilizado. Ela é responsável ainda pela proliferação do epitélio vaginal e pelo aumento da viscosidade do muco cervical.

Sobre as mamas, age promovendo o desenvolvimento dos lóbulos e alvéolos, com proliferação, aumento celular e desenvolvimento de função secretora[4].

Ciclo endometrial

Associado à produção cíclica mensal de estrógeno e progesterona pelos ovários, tem-se o ciclo endometrial no revestimento uterino, com três fases: menstrual (1º ao 5º dia); estrogênica ou proliferativa (6º ao 14º dia) e progestacional ou secretora (15º ao 28º dia).

- O ciclo sexual inicia-se com a fase menstrual (1º ao 5º dia), que ocorre quando o ovócito não é fecundado. Nessa fase, o corpo lúteo involui, e a secreção dos hormônios ováricos diminui, dando início à menstruação[4].
  O primeiro dia de sangramento é considerado o primeiro dia do ciclo[5]. Durante a menstruação, uma enorme quantidade de leucócitos, relacionada com um evento protetor, é liberada em conjunto com material necrótico e sangue.

Quatro a sete dias após o início da menstruação, a perda de sangue para, porque, nesse momento, o endométrio já se reepitelizou[4].

- A fase proliferativa ou estrogênica do ciclo endometrial ocorre do 6º ao 14º dia. Nela, o estrógeno secretado pelos ovários promove proliferação das células endometriais, restabelecendo o epitélio descamado com a menstruação. Assim, antes de ocorrer a ovulação, a espessura do endométrio aumenta bastante por causa do número crescente de células estromais e do crescimento progressivo das glândulas endometriais e novos vasos sanguíneos no endométrio. Em amostras obtidas diretamente do endométrio, é possível observar as células glandulares formando agrupamentos em "favo de mel", caracterizado por núcleos esféricos que variam pouco em tamanho. Pequenos nucléolos e figuras mitóticas ocasionais podem ser observados[1]. A ovulação ocorre entre o 14º e o 15º dia.
- A fase secretora ou progestacional do ciclo endometrial ocorre no 16º ao 28º dia. Aqui, maiores quantidades de progesterona e menores de estrógenos são secretados pelo corpo lúteo. O estrógeno, nessa fase, promove leve proliferação celular adicional no endométrio, enquanto a progesterona causa inchaço e desenvolvimento secretório acentuados. A finalidade é produzir um endométrio secretor que contenha nutrientes, dando condições à implantação de um óvulo. Por isso, há aumento dos depósitos de glicogênio e lipídios. Se o ovócito não for fertilizado, o corpo lúteo involui, ocorre diminuição na secreção dos hormônios ováricos e dá-se início a um novo ciclo[4]. Nessa fase, as células glandulares são grandes por conta de um citoplasma mais abundante e vacuolizado[1].

OBSERVAÇÕES RELACIONADAS COM A COLETA PARA CITOLOGIA HORMONAL

A coleta para a citologia hormonal pode ser realizada de forma única ou seriada (ver detalhes no Capítulo 3). A seriada possibilita a confecção de curvas para a avaliação de cada paciente, sendo estas denominadas curvas hormonais.

Como descrito anteriormente, o local ideal destinado à obtenção de um esfregaço para avaliação hormonal é o terço superior da parede lateral da vagina (zona mais sensível aos estímulos hormonais), sendo qualquer tipo de espátula satisfatório[5,9].

É importante reforçar que uma amostra do fundo de saco vaginal poderá ser utilizada nos casos em que a parede lateral da vagina estiver inviável. A qualidade da amostra, porém, é geralmente abaixo do ideal, já que o material obtido a partir do saco posterior da vagina normalmente contém células que foram esfoliadas e acumuladas ao longo de um período de tempo prolongado. Além disso, pode conter células ectocervicais, endocervicais ou endometriais, isoladamente ou em combinação, o que seria uma vantagem para a detecção do câncer, mas uma desvantagem para a avaliação do estado hormonal[3].

Em casos em que haja impossibilidade de obtenção de esfregaços vaginais (infância, virgindade, infecções vaginais, mulheres grávidas próximas ao parto), o estudo hormonal poderá ser realizado com a técnica do urocitograma. Os procedimentos técnicos para a realização da citologia hormonal são descritos no Capítulo 3.

Após confecção, fixação e coloração dos esfregaços, sua leitura com a objetiva de 10× possibilita a determinação do tipo predominante de células e a avaliação dos índices citológicos[5].

ÍNDICES CITOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO HORMONAL

Os índices citológicos são expressos para quantificar os tipos celulares ante a atividade hormonal. Além de avaliar o estado hormonal da paciente, outra aplicação desses índices é determinar as melhores vias de administração hormonal e apresentações farmacêuticas mais eficazes, quando são necessários tratamentos ou reposição hormonal. Eles também demonstram o início e a duração dos efeitos hormonais, realçando diferenças individuais das pacientes. Os índices fornecem valores relativos, nunca abso-

lutos, e são calculados contando um mínimo de 100 células escamosas em quatro campos microscópicos diferentes[5,10].

Índice de cariopicnose

O índice de cariopicnose é a porcentagem de células com núcleos picnóticos entre todas as células superficiais e intermediárias presentes no esfregaço. O microscópio de campo claro não permite, porém, uma diferenciação fundamental entre os núcleos picnóticos e vesiculares, sendo uma desvantagem para a realização desse índice. Também há diferenças de aproximadamente 15% na interpretação entre os avaliadores em um mesmo caso. O valor máximo do índice de cariopicnose situa-se no período ovulatório, mas, mesmo nesse período, a quantidade de células picnóticas varia entre as pacientes[3,5] e é estimado entre 50 e 85%[1].

Índice de eosinofilia

O índice de eosinofilia (IE) refere-se à porcentagem de células maduras eosinófilas entre todas as células escamosas maduras, independentemente do tamanho nuclear. Normalmente, o pico do IE coincide com o pico do índice de cariopicnose[1]. Esse índice é de fácil obtenção, porém pode ser alterado em decorrência de artefatos como a pseudoeosinofilia por falhas na fixação ou na coloração e mudanças por conta da influência do pH vaginal[3].

Índice de maturação (IM)

O IM celular ou de Frost é o mais informativo de todos e consiste na determinação de células parabasais, intermediárias e superficiais (P/I/S) do esfregaço, expressas em porcentagem. Apesar de existirem exceções, somente um ou dois tipos celulares ocorrem nos padrões hormonais: (1) células parabasais sozinhas; (2) células parabasais e intermediárias; (3) células intermediárias sozinhas; (4) células intermediárias e superficiais e (5) células superficiais sozinhas[3,11].

Valor de maturação

O valor de maturação ou índice de Meisels é calculado a partir do índice de maturação celular e corresponde ao somatório do número das células parabasais multiplicadas por 0, do número de células intermediárias multiplicadas por 0,5 e do número de células superficiais multiplicadas por 1 (parabasais × 0 + intermediárias × 0,5 + superficiais × 1). Assim, um valor de maturação igual a 100 indica uma população exclusiva de células superficiais, ao passo que um valor igual a 0, exclusivo de células parabasais[1]. Esse índice é o mais utilizado para a comunicação entre citologistas e em trabalhos científicos, porém não é indicado para a emissão de laudos citológicos destinados aos clínicos[3,12].

Índice de pregueamento celular

Determina a proporção de células pregueadas entre todas as células escamosas maduras[5]. Um alto índice de pregueamento celular é observado quando o IE é baixo e vice-versa, o que se dá pelo fato de que células que apresentam pregueamento são mais imaturas (células intermediárias) que as que perderam essa tendência (células superficiais)[3]. Células intermediárias normalmente apresentam citoplasma pregueado, principalmente durante a fase secretora do ciclo menstrual, ao passo que células superficiais possuem citoplasma achatado e poligonal, por ser rico em filamentos de queratina de alto peso molecular[5].

Índice de agrupamento celular

Representa a tendência de células formarem aglomerados, porém é de difícil execução, uma vez que as células agrupadas não permitem a realização de uma contagem exata[3].

TROFISMO DO EPITÉLIO

As alterações nos níveis de estrógeno e progesterona são características constantes da vida de uma mulher e refletem-se em seus esfregaços

cérvico-vaginais[5]. Isso porque esses hormônios se ligam a proteínas receptoras citoplasmáticas específicas e penetram através do citoplasma, onde alcançam o núcleo e se ligam a receptores específicos do DNA, formando-se o RNA mensageiro. O RNA mensageiro, por sua vez, liga-se a ribossomos e promove a síntese de proteínas específicas, como enzimas e proteínas estruturais, que são expressas no citoplasma das células-alvo[1].

A ação do estrógeno em receptores específicos do epitélio estratificado escamoso não queratinizado, que reveste a porção infravaginal do colo e da vagina, ocasiona sua proliferação, maturação e estratificação. Assim, há uma relação entre o estado trófico e o nível desse hormônio[13].

Quando a liberação de estrógeno é baixa, a análise citológica apresenta um baixo número de células escamosas superficiais eosinofílicas[14], com diminuição da microbiota lactobacilar e aumento no pH vaginal[15,16], podendo causar predisposição à infecção. Assim, o estrógeno induz a maturação epitelial completa. Ainda, na ausência desse hormônio, mecanismos essenciais à lubrificação vaginal são significativamente reduzidos[17,18].

A progesterona, por sua vez, promove a proliferação do epitélio vaginal e a inibição do processo de maturação celular[5]. Assim, quando os níveis de progesterona são superiores aos do estrógeno, ocorre predomínio citológico de células escamosas do tipo intermediário (Figura 2.3).

Não é possível estabelecer uma relação confiável entre o grau intermediário de maturação do epitélio escamoso e a ação de hormônios específicos. Assim, a maturação parcial do epitélio escamoso pode decorrer da baixa secreção de estrógeno e seus derivados, do efeito antagonista da progesterona ou dos androgênicos, do efeito de um agonista estrogênico muito utilizado, o tamoxifeno, ou do efeito da combinação de todos esses fatores[1].

O epitélio escamoso pode diferir quanto ao trofismo e assumir quatro padrões citológicos diferentes:

- *Hipertrófico*: quando, no esfregaço, há apenas células escamosas do tipo superficial e intermediário e há predomínio de células escamosas superficiais (mais de 50%) em relação às intermediárias. Este é visualizado quando o estrógeno está predominando, induzindo a maturação celular e, por isso, também é denominado padrão estrogênico (Figura 2.4).
- *Normotrófico*: quando, no esfregaço, há apenas células escamosas do tipo superficial e intermediário, e estas podem estar equivalentes em quantidade ou pode haver predomínio de células intermediárias. Ocorre quando a mulher apresenta maior taxa de secreção de progesterona ou equilíbrio entre os hormônios ováricos (Figura 2.5).
- *Hipotrófico*: quando, no esfregaço, há predomínio de células escamosas do tipo intermediário, porém com presença de células parabasais. Nesse caso, ainda pode haver células maduras do tipo superficial, porém

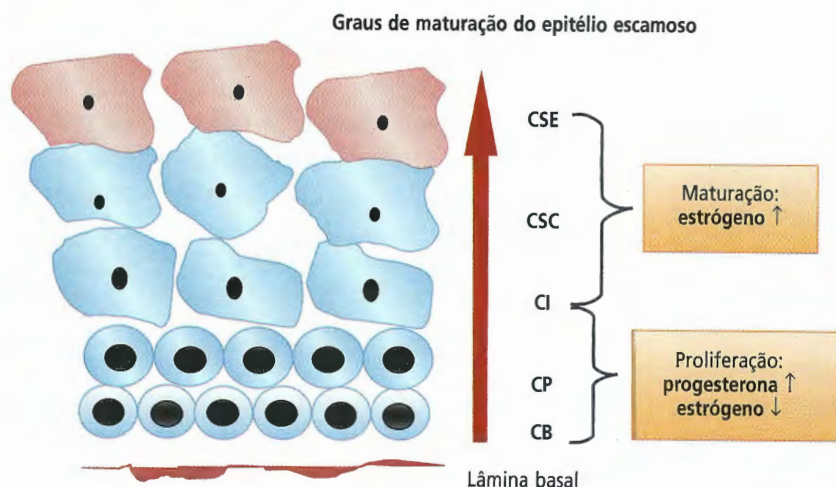



Figura 2.3 – Representação esquemática da atuação do estrógeno e da progesterona na proliferação e na maturação do epitélio estratificado escamoso não queratinizado vaginal e cervical. CSE = células superficiais eosinofílicas; CSC = células superficiais cianofílicas; CI = células intermediárias; CP = células parabasais; CB = células basais.

978-85-4120-024-0

Figura 2.4 – Fotomicrografia mostrando epitélio hipertrófico com predomínio de células escamosas do tipo superficial, poligonais e planas, com núcleos picnóticos e abundante citoplasma acidófilo. *100x*.

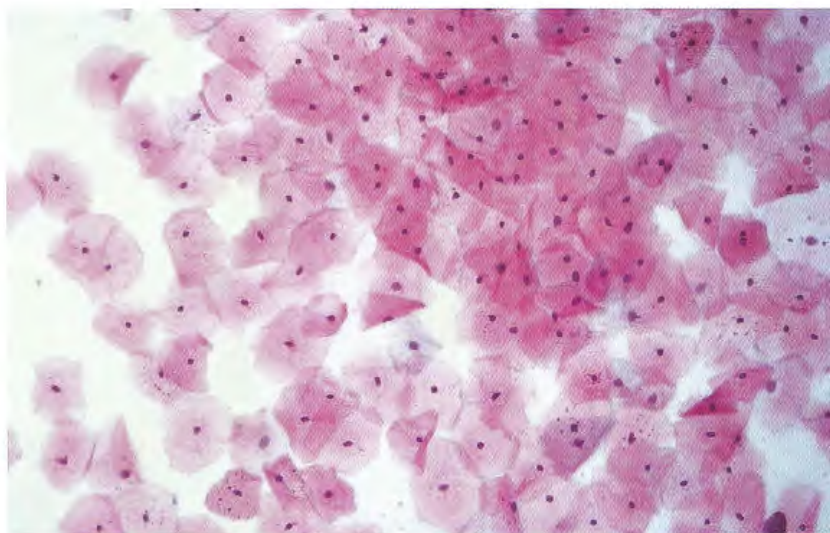



Figura 2.5 – Fotomicrografia mostrando epitélio normotrófico com predomínio de células escamosas do tipo intermediário, poligonais, com núcleos vesiculares apresentando um padrão de cromatina fina e citoplasma abundante, frequentemente basófilo e raramente acidófilo. *200x*.

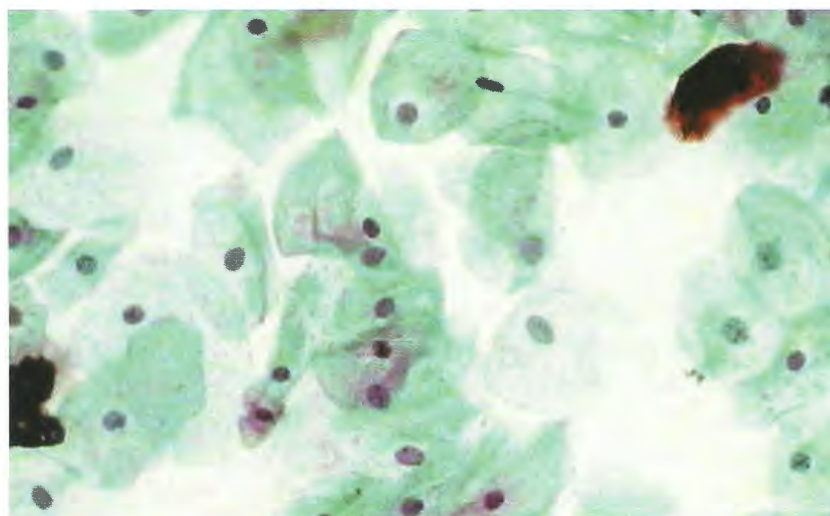



Figura 2.6 – Fotomicrografia mostrando epitélio hipotrófico com predomínio de células escamosas do tipo intermediário e raras células do tipo parabasal (*seta*), sendo as últimas caracterizadas por apresentarem margens redondas, citoplasma fracamente basofílico e núcleos vesiculares com cromatina fina e uniformemente granular. *100x*.

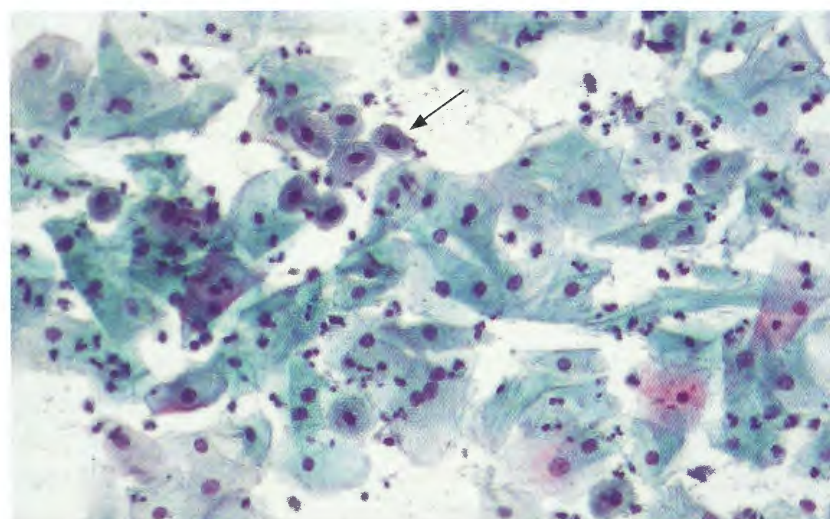
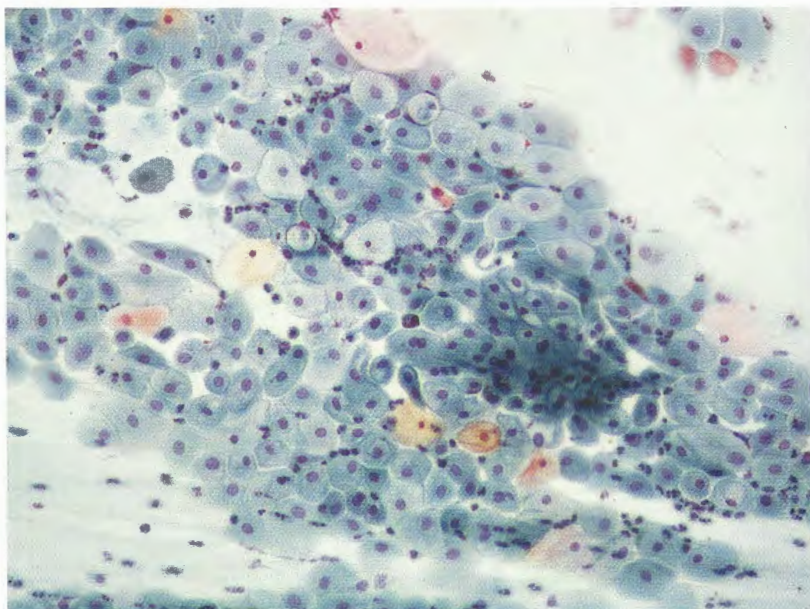



Figura 2.7 – Fotomicrografia mostrando epitélio atrófico com predomínio de células escamosas do tipo parabasal, com margens redondas, citoplasma fracamente basofílico e núcleos vesiculares com cromatina fina e uniformemente granular. *100x*.

sua quantidade será proporcionalmente oposta à de células parabasais, ou seja, quanto maior a quantidade desta, menor será a probabilidade de haver células superficiais no esfregaço. Esse padrão normalmente é observado quando a menina começa a secretar os hormônios ováricos ou em mulheres que já não secretam grandes quantidades deles, como na pré-menopausa (Figura 2.6).

- *Atrófico*: quando, no esfregaço, há predomínio de células escamosas do tipo parabasal em relação às intermediárias. Agora, pode-se dizer que há ausência de estrógeno e hormônios relacionados, levando a acentuada redução no nível de maturação do epitélio. Assim, as células escamosas superficiais tendem a desaparecer (Figura 2.7).

PADRÕES CITOLÓGICOS NAS DIFERENTES FASES DA VIDA DA MULHER

Como descrito no item anterior, são observadas, durante as várias fases de vida da mulher, alterações hormonais. Elas afetam os epitélios escamoso, glandular endocervical e endometrial, promovendo mudanças nos esfregaços cérvico-vaginais[5]. Assim, o padrão citológico considerado normal varia de acordo com o estado hormonal.

Infância

Logo após o nascimento (até a quarta semana de vida), os esfregaços vaginais apresentam um padrão celular semelhante ou idêntico ao da mãe[3], por estar sob ação da atividade hormonal materna[5]. Ou seja, a recém-nascida, por causa do estímulo dos esteroides placentários (estrógeno, e, principalmente, progesterona), apresenta um epitélio vaginal trófico, com a presença de células epiteliais escamosas do tipo intermediário (ricas em glicogênio)[19]. Há ausência de leucócitos, hemácias e microbiota bacteriana.

No entanto, esse padrão celular altera-se rapidamente por causa da ausência de estímulo hormonal, que é seguido da diminuição do índice proliferativo do epitélio escamoso, tornando-se atrófico[3], representado quase exclusivamente por células epiteliais escamosas das camadas profundas do tipo parabasal[19] (índice de maturação [IM] = 70/30/00 até 100/00/00).

A avaliação dos aspectos citológicos de uma menina pode ser indicada em caso de infecções vaginais ou distúrbios hormonais, por exemplo, puberdade precoce[5]. O melhor método de estudo

é a coleta do material vaginal obtido com uma pequena pipeta, porém o sedimento urinário pode ser utilizado (ver *urocitograma*, no Capítulo 3)[1].

Pré-puberdade

Puberdade significa o início da fase adulta. O período da puberdade é marcado por aumento gradual na secreção dos hormônios gonadotróficos pela hipófise anterior, aproximadamente aos 8 anos de idade, culminando com o início da menstruação, normalmente entre 11 e 16 anos[4].

Nesse período, ocorre a maturação gradual do epitélio escamoso vaginal, com aumento gradativo da espessura (de atrófico a hipotrófico), até alcançar o padrão da menacme.

Menacme

É o período de estabilização dos ciclos menstruais que normalmente se tornam bifásicos, no qual o epitélio escamoso vaginal estará sob a ação do estrógeno e da progesterona (Figura 2.8, *A*) [19].

Fase menstrual (1º ao 5º dia do ciclo)

Durante essa fase, os esfregaços vaginais contêm células epiteliais escamosas, principalmente do tipo intermediário, hemácias, detritos celulares, leucócitos, raras células glandulares endocervicais, células glandulares endometriais e células estromais isoladas ou em agrupamentos de tamanhos variáveis[5].

Fase estrogênica inicial (6º ao 12º dia)

Denominada, também, fase proliferativa ou folicular. Nos esfregaços, ainda há predomínio de células escamosas intermediárias, em decorrência do efeito da progesterona do ciclo anterior. Conforme os níveis de estrógeno se elevam, há aumento progressivo de células epiteliais escamosas do tipo superficial. É possível observar raras hemácias e diminuição do número de leucócitos. Células endometriais ainda podem ser visualizadas (até, no máximo, o 12º dia) e podem estar acompanhadas de histiócitos, descrito como "fenômeno de êxodo" (ver Capítulo 1).

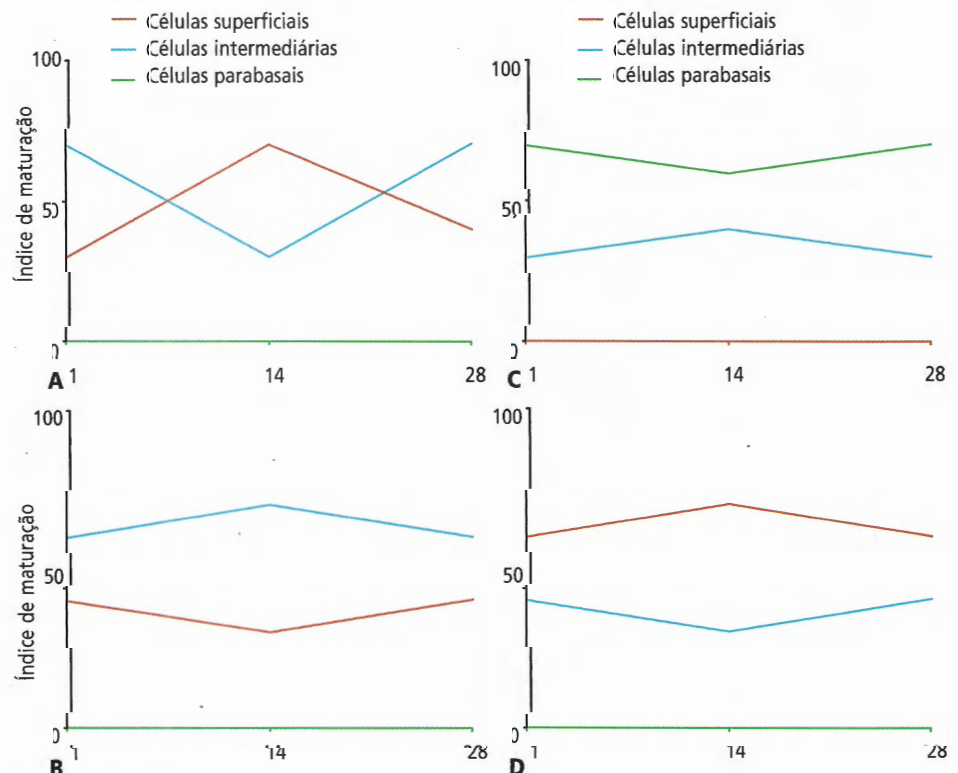



Figura 2.8 – Figura mostrando exemplos de curvas hormonais ovulatória (*A*), normotrófica (*B*), atrófica (*C*) e hiperestrogênica (*D*), de acordo com o índice de maturação das células epiteliais escamosas, durante um ciclo sexual de 28 dias.

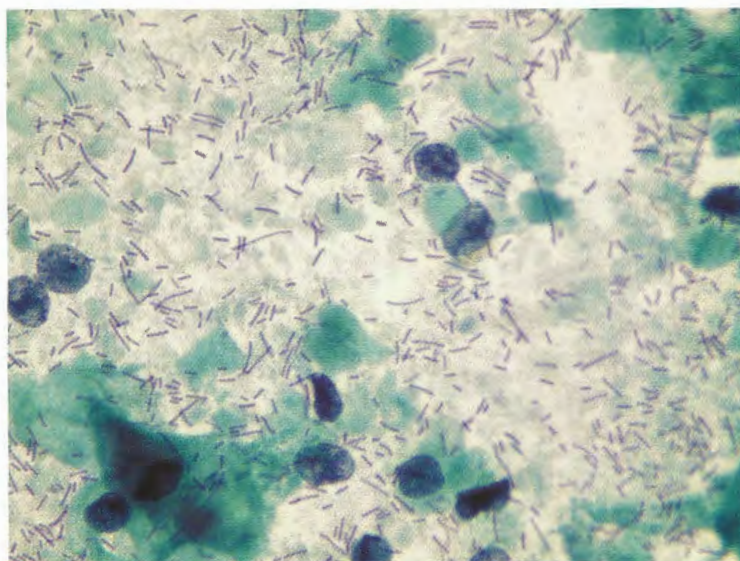



Figura 2.9 – Fotomicrografia mostrando epitélio na fase progestacional com presença de lactobacilos abundantes e citólise de células intermediárias, onde é possível visualizar núcleos nus e detritos citoplasmáticos, conferindo ao esfregaço um aspecto "sujo". *400×.*

O muco cervical pode aparecer no esfregaço como uma estrutura cristalina (tipo samambaia) e desaparecer pouco antes da ovulação, quando se torna líquido[1].

Fase estrogênica avançada ou pré-ovulatória (12º e 13º dias)

Ainda denominada folicular ou proliferativa. Nos esfregaços, visualizam-se quantidades crescentes de células epiteliais escamosas superficiais isoladas, eosinofílicas, de formato achatado e núcleo picnótico[5]. É possível observar halos perinucleares em volta desses núcleos densos e picnóticos, os quais representariam a intensidade e a rapidez da cariopicnose[9]. Os leucócitos e os histiócitos tornam-se cada vez mais raros, até desaparecerem[5].

Do 6º ao 13º dia, as células glandulares endocervicais normalmente apresentam formato esférico, com citoplasma basofílico e núcleo central[5].

Fase ovulatória (14º e 15º dias)

Nessa fase, ocorre um pico na liberação do LH e do estrógeno, consequentemente, um pico de células superficiais achatadas, eosinofílicas e núcleos picnóticos, caracterizando o máximo de maturidade celular de uma paciente. Leucócitos são raros.

As células glandulares endocervicais são grandes, com citoplasma claro e preenchido por muco. Os núcleos podem demonstrar projeções escuras e papiliformes[5].

Fase progestacional (16º ao 28º dia)

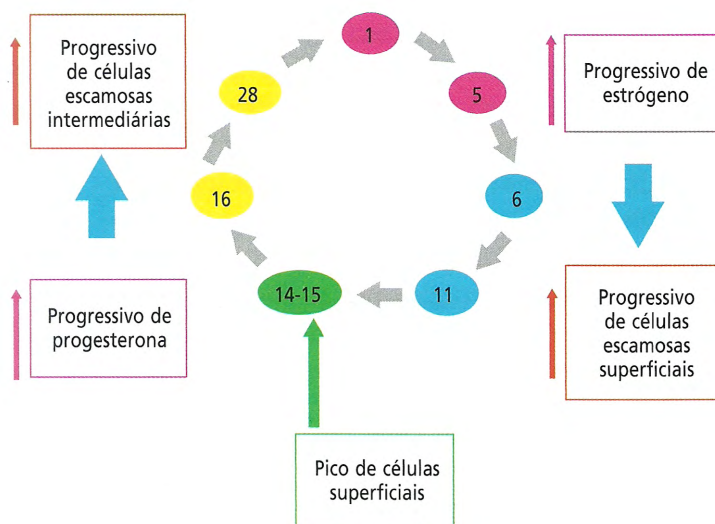
Denominada, também, fase secretora ou lútea. Ocorre redução progressiva na proporção de células epiteliais escamosas do tipo superficial, sendo estas substituídas por células intermediárias, em razão da ação da progesterona. Normalmente são observados infiltrado leucocitário e muco[5].

Há lactobacilos em abundância, que podem causar a citólise de células intermediárias, de modo que, nos esfregaços, é possível visualizar núcleos nus e detritos citoplasmáticos acompanhados de um número cada vez maior de leucócitos, conferindo ao esfregaço um aspecto "sujo" (Figura 2.9)[5].

A Figura 2.10 mostra as mudanças citológicas do epitélio vaginal, em resposta às alterações hormonais em um ciclo menstrual ovulatório de 28 dias.

Gestação

Durante a gestação, a citologia vaginal deixa de apresentar modificações cíclicas, de modo que o epitélio assume um padrão característico pela acentuada estimulação hormonal do tipo progestacional (Figura 2.8, *B*)[5].

Figura 2.10 – Padrão citológico de descamação de células vaginais em um ciclo menstrual ovulatório de 28 dias. Dias 1 a 5 = menstruação; dias 6 a 11 = fase estrogênica inicial; dias 12 e 13 = fase estrogênica avançada; dias 14 e 15 = ovulação; 16 a 28 = fase progestacional (lútea).

Nos primeiros 3 meses, como visto anteriormente, sob ação da hCG, o corpo lúteo secreta os hormônios estrógeno e progesterona. Após 3 meses, a placenta passa a ser responsável pela secreção hormonal, com predomínio de produção de progesterona.

No início da gravidez (primeiras 6 semanas), os esfregaços vaginais ainda apresentam aspecto semelhante ao pré-menstrual, podendo demonstrar um leve efeito estrogênico. Assim, há predomínio de células escamosas intermediárias, mas pode haver células superficiais.

O esfregaço dito gestacional é verificado a partir do segundo ou do terceiro trimestre da gravidez e é composto de células escamosas intermediárias, incluindo células ricas em glicogênio, com núcleo periférico e bordas bem-definidas (conhecidas como células naviculares; Figura 2.11), lactobacilos e citólise[5]. A camada superficial normalmente está muito fina e reduzida, podendo estar ausente (IM: 00/100/00)[19]. Esse padrão citológico não é observado exclusivamente na gravidez, mas padrões semelhantes podem ser verificados no início da menopausa ou em alguns casos de amenorreia[5].

As células endocervicais normalmente apresentam-se maiores, com citoplasma preenchido por muco, assumindo um aspecto claro e abundante[5]. Os núcleos são proeminentes[1].

Células deciduais podem ser identificadas em esfregaços cervicais. São grandes células mononucleadas, que aparecem isoladas ou em grupos, com abundante citoplasma vacuolizado eosinofílico ou basofílico, com núcleo vesicular com nucléolos visíveis. Ainda, o fenômeno de Arias-Stella, caracterizado por grandes células com núcleos hipercromáticos em glândulas endometriais, pode ser visualizado, principalmente na presença de produtos de concepção ou gravidez ectópica[1].

Algumas alterações citológicas podem indicar anomalias hormonais na gestação, por exemplo, em caso de aborto iminente, há aumento de mais

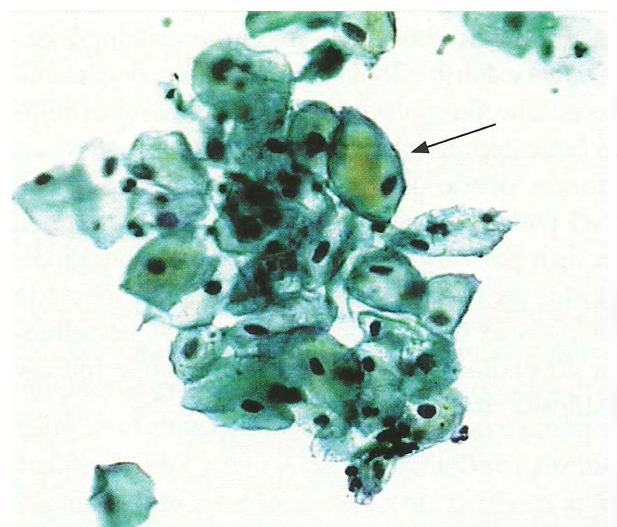



Figura 2.11 – Fotomicrografia mostrando epitélio na fase gestacional, com células pequenas com formas naviculares e citoplasmas basofílicos, e depósitos de glicogênio intracitoplasmáticos que geram uma coloração amarelada no citoplasma (*seta*). Núcleos vesiculares e cromatina finamente granular. *200*x.

de 10% nas células escamosas superficiais, com desaparecimento das células naviculares. Em aborto inevitável, há células endometriais e, ocasionalmente, células sinciciotrofoblásticas. Em óbito fetal, o aspecto do esfregaço passa a ser atrófico do tipo pós-parto, com presença de escamas anucleadas. A presença de maturidade celular completa na gestação pode indicar deficiência de progesterona[3].

Citologia no pós-parto (puerpério)

Esse padrão citológico dura aproximadamente 6 semanas após o parto, podendo prolongar-se em casos de amamentação regular.

Algumas semanas antes do nascimento, a secreção de progesterona diminui, pois a placenta começa a degenerar. Após o parto, durante a lactação, o ciclo sexual é interrompido pela redução na liberação do GnRH, que causa a supressão da secreção de LH e FSH, pela hipófise anterior. Essa diminuição da atividade do sistema GnRH não está bem-estabelecida, podendo estar relacionada com diversas alterações neuroendócrinas e com a possível ação inibitória da prolactina[6].

Assim, o epitélio passa a ter um padrão de atrofia com predomínio de células escamosas parabasais e intermediárias com bordas arredondadas ou ovais e denso citoplasma periférico, denominadas células puerperais. Normalmente essas células estão acompanhadas de leucócitos, histiócitos e muco, dando um aspecto sujo ao esfregaço[5].

O padrão atrófico em diferentes níveis pode persistir por vários meses, dependendo, principalmente, da lactação, porém raramente persiste por mais de 6 meses após o parto[3]. A persistência do padrão atrófico após 1 ano pode indicar distúrbio endócrino grave[1].

Menopausa

Entre 40 e 50 anos de idade, o ciclo sexual geralmente torna-se irregular, e a ovulação muitas vezes não ocorre[4]. A menopausa ou o desaparecimento dos ciclos menstruais normais é consequência do decréscimo na produção de hormônios esteroides. Tende a instalar-se de forma progressiva[5].

Durante toda a vida reprodutiva da mulher, cerca de 400 folículos primordiais crescem em folículos maduros e ovulam, e centenas de milhares de ovócitos degeneram-se. Em torno dos 45 anos de idade, apenas poucos folículos primordiais continuam a ser estimulados pelo FSH e pelo LH e a produção de estrógeno pelos ovários diminui à medida que o número de folículos primordiais aproxima-se de zero[4].

Três padrões citológicos básicos podem ser observados na menopausa. Com a diminuição da secreção de estrógenos, ocorre inibição gradativa da proliferação e maturação das células epiteliais escamosas[19]. No início, predominam as células epiteliais escamosas intermediárias, porém algumas células superficiais podem estar presentes, caracterizando baixa atividade estrogênica. Com o tempo, que pode variar de poucos meses até vários anos, há queda progressiva da atividade estrogênica, passando a haver predomínio de células escamosas intermediárias associadas à presença de células escamosas parabasais, representando o epitélio hipotrófico.

Por fim, é possível observar a presença do epitélio com ausência de maturação ou atrófico, com predomínio de células escamosas parabasais, indicando baixíssima produção estrogênica[5] (ver Figura 2.8, *C*).

O epitélio atrófico é mais suscetível a infecções em razão do menor número de camadas celulares, por isso geralmente é possível observar a presença de processo inflamatório intenso[5].

A menopausa clínica e a citológica podem não coincidir, ou seja, a paciente pode apresentar ciclos menstruais regulares e esfregaço citológico já mostrando início de menopausa. Por outro lado, em mulheres com menopausa clínica, o tempo para a instalação da atrofia também pode variar, ocorrendo poucos meses após a última menstruação, ou jamais ocorrer, persistindo o predomínio de células epiteliais escamosas intermediárias por toda a vida[3], como nas que continuam sexualmente ativas ou que mantêm certa produção de esteroides adrenais.

Nos epitélios glandulares endocervical e endometrial, também se observa regressão progressiva, com escassez das glândulas[19] e, consequentemente, menor produção de muco, o que costuma levar ao dessecamento do epitélio escamoso vaginal. O dessecamento faz com que as células apresentem aspecto achatado, com variação no tamanho e na forma, eosinofilia citoplasmática, cariorrexe e picnose nuclear que pode sugerir hipercromasia[5]. Essas características celulares podem sugerir carcinoma escamoso e criar problemas diagnósticos, que podem ser esclarecidos pela administração de estrogênio, que, por sua vez, é capaz de restabelecer a maturação do epitélio escamoso, de modo que as anormalidades causadas pela atrofia desaparecerão. Por outro lado, se houver malignidade, as alterações celulares persistirão[5]. Nesse epitélio, as células endocervicais são normalmente escassas ou ausentes nos esfregaços cervicais[1].

Como consequência da necrose celular, histiócitos mono ou multinucleados podem estar presentes e frequentemente apresentam fragmentos de material fagocitado[1].

Na menopausa, pode haver mudanças fisiológicas marcantes, incluindo fogachos, caracterizados por rubor extremo da pele; sensações psíquicas de dispneia; irritabilidade; fadiga; ansiedade; diminuição da resistência e calcificação dos ossos no corpo inteiro[4]. Esses sintomas estão relacionados com os baixos índices de estrogênio[20].

Alguns distúrbios do ciclo menstrual e citologia

A citologia vaginal pode auxiliar na investigação de distúrbios hormonais ou outros do ciclo menstrual[5].

O padrão do esfregaço associado à cromatina sexual pode dar informações sobre a causa de amenorreias (ausência de menstruação). As amenorreias podem ser primárias, quando a paciente nunca menstruou, ou secundárias, em que os ciclos menstruais deixaram de ocorrer após determinado tempo. As causas podem ser genéticas, anatômicas (p. ex., ausência de útero), hormonais (em nível de ovários, hipófise, hipotálamo ou adrenocortical) ou psicológicas[5].

Em geral, não existe um esfregaço típico das amenorreias, a menos que por gravidez[9]. A maturação do epitélio escamoso indica atividade ovárica ou uso de terapia hormonal. Em caso de inexistência ou deficiência da função ovárica, disfunção hipofisária ou até anormalidade genética, como no caso da síndrome de Turner, é comum a presença de um esfregaço atrófico, já que ocorre hipoatividade estrogênica associada à hipoatividade progestágena[5].

É possível que a hipoatividade estrogênica esteja combinada à hiperatividade progestágena, por exemplo, em luteoma de ovário e cistos luteínicos.

Por outro lado, em alguns casos, pode-se observar um padrão celular altamente maduro, indicando secreção exagerada de estrógeno, como em tumores ováricos com atividade estrogênica[3,5]. Nestes, o padrão celular é representado por uma curva monofásica hiperestrogênica (Figura 2.8, *D*), em que há predomínio de células escamosas superficiais durante todo o ciclo sexual.

Em casos de puberdade precoce, o esfregaço vaginal atrófico é substituído pelo padrão de maturação de células escamosas[3].

EFEITOS DOS TRATAMENTOS HORMONAIS SOBRE ESFREGAÇOS VAGINAIS

Estrogênio

Com exceção da gravidez normal, a administração parenteral ou oral de estrógenos promove um padrão citológico de maturação completa do epitélio escamoso, como o que ocorre em condições fisiológicas[3]. A administração de cremes vaginais que contêm estrógeno também pode refletir no padrão citológico. Assim, o epitélio sobre influência desse hormônio apresenta porcentagem elevada de células superficiais eosinofílicas, às vezes de grande tamanho, com núcleos picnóticos.

Progesterona

A influência da progesterona no epitélio vaginal depende do estado celular preexistente à sua administração. Se um epitélio está sendo estimulado pelo estrógeno, o resultado da administração da progesterona é o decréscimo na maturidade celular. Por outro lado, se o estado inicial de um epitélio é representado pela atrofia, após administração da progesterona, este passará a ser composto de células intermediárias. Já em um esfregaço progestacional, não haverá modificação observável[3,5].

Estrógenos e progesterona

Caso os estroprogestativos orais sejam administrados por um curto período de tempo, o efeito no epitélio vaginal será intermediário e dependente de cada hormônio. A longo prazo, porém – que varia de acordo com cada paciente (2 ou 3 anos) –, pode-se observar atrofia dificilmente reversível[5].

Andrógenos

O resultado citológico da administração de andrógenos é bastante similar àquele descrito para progesterona e também depende do padrão de esfregaço inicial. Um esfregaço inicialmente estrogênico mostra regressão da maturidade epitelial, um esfregaço lúteo não se modifica, já um esfregaço atrófico apresenta uma maturação moderada[3].

Tamoxifeno

É um importante agonista estrogênico, amplamente utilizado nos dias atuais no tratamento e na prevenção do câncer de mama. Estudos mostram que esse medicamento produz aumento na maturação do epitélio escamoso em mulheres menopausadas[1].

Referências

1. KOSS, L. G.; MELAMED, M. R. **Koss' Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases**. 5. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
2. AYALA, M. J.; WILAPLANA, E. V.; ORTIZ, F. G. *et al.* **Citopatologia Ginecológica**. 2. ed., Barcelona: Editorial Científico-Médica, 1985. p. 151-178.
3. BIBBO, M. **Comprehensive Cytopathology**. New York: Saunders, 1997. p. 1122.
4. GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; ESBÉRARD, C. A. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 1115.
5. KOSS, L. G.; GOMPEL, C.; BERGERON, C. **Introdução à Citopatologia Ginecológica com Correlações Histológicas e Clínicas**. São Paulo: Roca, 2006. p. 203.
6. VERAS, B. A.; NARDI, E. A. Hormônios sexuais femininos e transtornos do humor. **J. Bras. Psiquiatr.**, v. 54, n. 1, p. 57-68, 2005.
7. SIROTKIN, A. V.; MAKAREVICH, A. V.; GROSMANN, R. Protein kinases and ovarian functions. **J. Cell. Physiol.**, v. 226, p. 37-45, 2010.
8. CONCEIÇÃO, J. C. J. **Ginecologia Fundamental**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 294.
9. CARVALHO, G. **Citologia do Trato Genital Feminino**. 4. ed., São Paulo: Atheneu, 2002. p. 346.
10. BOSCHANN, H. W. In which especial cases is it essential to express the cytologic report in indices? **Acta. Cytol.**, v. 12, n. 2, p. 87-127, 1968.
11. LUSTOSA, A. T.; GIRÃO, M. J. B. C.; SARTORI, M. G. F. et al. Citologia hormonal do trato urinário baixo e da vagina de mulheres na pós-menopausa, antes e durante estrogenioterapia oral e transdérmica. **RBGO**, v. 24, n. 9, p. 573-577, 2002.
12. MEISELS, A. The maturation value. **Acta. Cytol.**, v. 11, p. 249-55, 1967.
13. LARA, L. A. S.; USECHE, B.; FERRIANI, R. A. et al. The effects of hypoestrogenism on the vaginal wall: interference with the normal sexual response. **J. Sex. Med.**, v. 6, p. 30-39, 2009.
14. NILSSON, K.; RISBERG, B.; HEIMER, G. The vaginal epithelium in the postmenopause cytology, histology and pH as methods of assessment. **Maturitas**, v. 21, p. 51-56, 1995.
15. BASSON, R. Hormones and sexuality: current complexities and future directions. **Maturitas**, v. 57, p. 66-70, 2007.
16. BACHMANN, G. Urogenital ageing: an old problem newly recognized. **Maturitas**, v. 22, p. S1-S5, 1995.
17. LEVIN, R. J. VIP, vagina, clitoral and periurethral glans – an update on human female genital arousal. **Exp. Clin. Endocrinol.**, v. 98, p. 61-69, 1991.
18. KIM, N. N.; MIN, K.; PESSINA, M. A. et al. Effects of ovariectomy and steroid hormones on vaginal smooth muscle contractility. **Int. J. Impot. Res.**, v. 16, p. 43-50, 2004.
19. SILVA FILHO, A. M.; LONGATTO FILHO, A. **Colo Uterino & Vagina:** processos inflamatórios: aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. p. 209.
20. PRIOR, J. C. Perimenopause: the complex endocrinology of the menopausal transition. **Endocr. Rev.**, v. 19, p. 397-428, 1998.

Capítulo 3

Técnicas de Processamento e Rastreamento dos Esfregaços Citológicos Cérvico-Vaginais

Agenor Storti Filho
Monalisa Wolski Pereira

INTRODUÇÃO

O exame de citologia cérvico-vaginal é constituído por diversas etapas, incluindo a coleta da amostra citológica, a fixação do material biológico, a identificação do material e o encaminhamento ao laboratório de citologia para processamento técnico, avaliação microscópica, conclusão diagnóstica e emissão de laudo citológico. Essas etapas devem ser realizadas sob rígido e minucioso controle de qualidade interno e externo (ver detalhes no Capítulo 13), levando ao diagnóstico fidedigno que represente a real condição citológica da paciente, norteie a conduta clínica e minimize os resultados falso-positivos e negativos.

COLETA

O objetivo deste tópico não será uma aprendizagem sobre técnicas de coleta e todos os seus desdobramentos, mas uma orientação de como deverá ser realizada, enfatizando as dificuldades que podem comprometer a adequabilidade da amostra. A coleta, apesar de simples, deve ser sistematizada, pois influencia diretamente a eficácia do rastreamento das alterações celulares.

Algumas orientações devem ser feitas à paciente antes da coleta para evitar qualquer procedimento que altere o conteúdo vaginal e interfira na adequabilidade da amostra. Recomenda-se evitar relação sexual e uso de duchas vaginais 24 h antes da coleta e/ou uso de cremes ou pomadas

vaginais nas 48 h que antecedem o exame. Durante a idade reprodutiva, os esfregaços devem ser obtidos preferencialmente no meio do ciclo menstrual.

Conforme solicitação clínica, os procedimentos de coleta podem ser diferenciados entre citologia cérvico-vaginal, hormonal isolada ou seriada e urocitograma.

Citologia cérvico-vaginal

Tem como objetivo principal a prevenção do câncer ginecológico, mas também a avaliação da ação dos hormônios ováricos e dos processos inflamatórios. Para isso, é necessário realizar coleta de amostras da endocérvice, da ectocérvice e da parede lateral da vagina.

Coleta do material e confecção dos esfregaços

O esfregaço ideal contém representação citológica do epitélio da ectocérvice (epitélio escamoso), endocérvice (epitélio glandular) e inclui a ZT[1]. A presença de células metaplásicas ou endocervicais, representativas da JEC, é considerada um indicador da qualidade da amostra, pois, nessa região, ocorre a ZT, local mais suscetível a alterações genéticas e à ocorrência da maioria dos processos pré-neoplásicos e neoplásicos do colo uterino.

Segundo Koss e Meland[1], um esfregaço adequado deve conter:

- Células escamosas da ectocérvice.
- Células metaplásicas imaturas.
- Células endocervicais ou muco cervical (esse último controverso entre diferentes autores).
- Nos esfregaços de pré-púberes ou de mulheres pós-menopausadas, as células endocervicais e/ou muco cervical podem estar ausentes devido a dificuldades na coleta.

Existem divergências sobre como proceder à coleta do material vaginal. Alguns serviços realizam a coleta do fórnix, também chamado de fundo de saco, já outros preferem a raspagem do terço superior da parede lateral da vagina, ambas as regiões coletadas com a extremidade arredondada da espátula de Ayre. O material de fundo de saco é limitado, por conter células naturalmente descamadas das mucosas vaginal e cervical, que são pouco preservadas, além de muco, leucócitos, histiócitos, flora e detritos celulares necróticos em vias de eliminação. Mais raramente, recolhem-se também células endometriais e tubárias. A principal vantagem da coleta de fundo de saco é a diversidade de células provenientes de todo o trato genital, revelando-se mais eficaz que a do terço superior da parede lateral vaginal quando a suspeita clínica é de tumores endometriais, tubários, ováricos ou metastáticos[2].

Existem também divergências e variações quanto à disposição do esfregaço na lâmina, se vertical ou horizontal, bem como quanto ao número de lâminas a serem utilizadas, se uma ou duas. A técnica sugerida por Wied e Bahr (1959) é a coleta tríplice, na qual são coletados materiais da parede lateral da vagina, da ectocérvice e da endocérvice, sendo a mais comumente realizada e internacionalmente preconizada e aceita[2]. Uma única lâmina pode conter as amostras das três regiões anatômicas (Figura 3.1, *A*) ou os materiais serem distribuídos em duas lâminas. Com os materiais da ectocérvice e da endocérvice, serão confeccionados esfregaços em uma

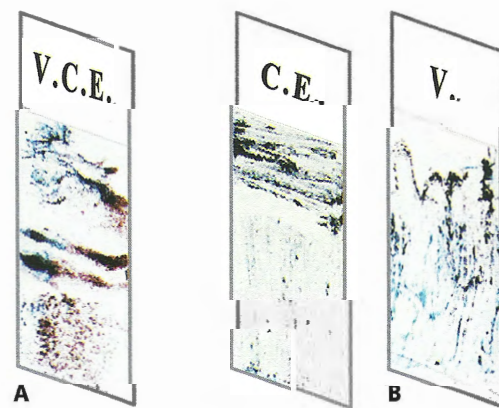



Figura 3.1 – A amostra cérvico-vaginal com coleta tríplice poderá ser adequadamente distribuída em apenas uma lâmina (*A*) ou em duas (*B*), conforme critério clínico.

978-85-4120-024-0

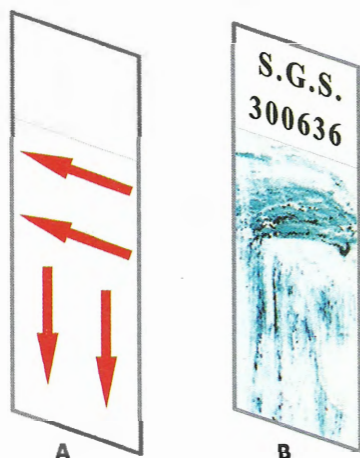



Figura 3.2 – As amostras obtidas das regiões da ectocérvice e da endocérvice devem ser distribuídas na lâmina em sentidos opostos, conforme representado no esquema (*A*) e na foto (*B*).

lâmina e com o material da parede lateral da vagina em outra lâmina (Figura 3.1, *B*).

A coleta tríplice com esfregaço confeccionado em uma única lâmina permite a leitura microscópica rápida, mas exige grande destreza no momento da coleta e da fixação para evitar o ressecamento do esfregaço. A realização do esfregaço em duas lâminas aumenta a área de disposição do material celular, possibilita a rápida fixação e a avaliação isolada das células da parede lateral vaginal, porém a leitura é mais demorada. Independentemente da confecção do esfregaço em uma ou duas lâminas, o importante é que exista representatividade das três regiões (parede lateral da vagina, ectocérvice e endocérvice), sem que ocorra o ressecamento do material coletado. No Capítulo 10, cujo tema é classificação para diagnóstico citológico, a adequabilidade das amostras cérvico-vaginais é abordada, principalmente no sistema de Bethesda.

Independentemente ainda da opção escolhida (esfregaço em uma ou duas lâminas), é importante que a direção de disposição das amostras da ecto e da endocérvice na lâmina ocorra em sentidos distintos, horizontal e vertical, respectivamente, ou vice-versa, para facilitar a diferenciação epitelial (Figura 3.2).

O material coletado deve ser estendido pela lâmina de maneira uniforme, com suave pressão, uma vez que movimentos irregulares podem alterar a morfologia celular e/ou criar sobreposições. A distribuição de uma quantidade uniforme da amostra sobre a lâmina também é importante, já que uma quantidade abundante ou escassa pode oferecer dificuldades na interpretação do exame. Observa-se que a dispersão do material sobre a lâmina é um dos passos mais importantes na preparação citológica e que um esfregaço ideal deve apresentar uma camada de material transparente e de distribuição homogênea[3]. A Figura 3.3 mostra a representação de lâminas com quantidade de amostra aparentemente ideal, insuficiente e excessiva.

A seguir, são descritos os procedimentos básicos para coleta e confecção dos esfregaços citológicos, tomando-se como exemplo a coleta em duas lâminas.

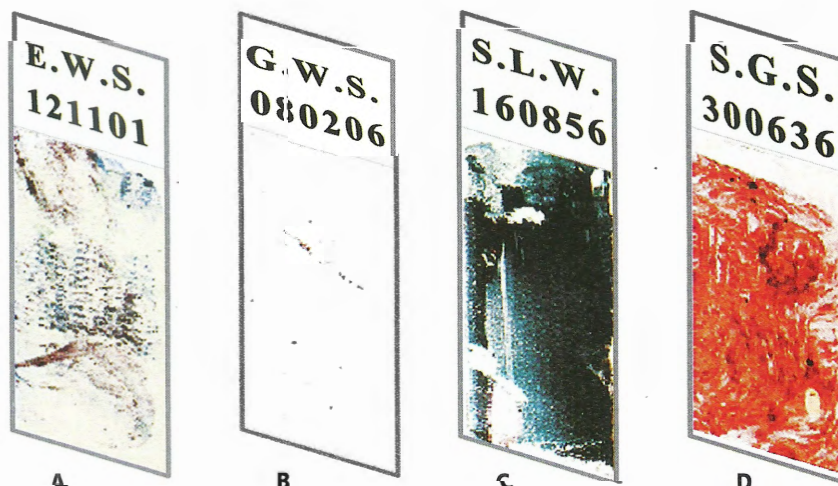



Figura 3.3 – Lâminas com representação de esfregaço cérvico-vaginal com amostra (*A*) adequada, (*B*) insuficiente, (*C*) excessiva e (*D*) malfixada. As amostras (*B*), (*C*) e (*D*) são inadequadas e podem comprometer o diagnóstico.

Figura 3.4 – Material necessário para realização de coleta cérvico-vaginal. (*A*) Lâmina. (*B*) Escova endocervical. (*C*) Espátula de Ayre. (*D*) Recipiente para transporte. (*E*) Fixador. (*F*) Espéculo.

978-85-4120-024-0

Materiais necessários para a coleta

- Espátula de Ayre (Figura 3.4, *C*).
- Escova endocervical (Cytobrush) (Figura 3.4, *B*).
- Espéculo vaginal (Figura 3.4, *F*).
- Lâminas de vidro com extremidade fosca (Figura 3.4, *A*).
- Fixador celular (*spray* ou álcool a 95%) (Figura 3.4, *E*).
- Recipiente apropriado para o transporte das lâminas (Figura 3.4, *D*).

Procedimentos

- Anotar as iniciais do nome da paciente com auxílio de um lápis na parte fosca das lâminas e identificar uma delas com a letra "V" (vaginal) e a outra com "CE" (cervical-endocervical).
- Realizar o raspado da parede lateral da vagina em seu terço superior com a parte arredondada da espátula de Ayre (Figura 3.5, *D*). Obter a amostra, realizando apoio firme na borda lateral da espátula contra uma das paredes laterais da vagina, com movimentos de baixo para cima, vagarosa-

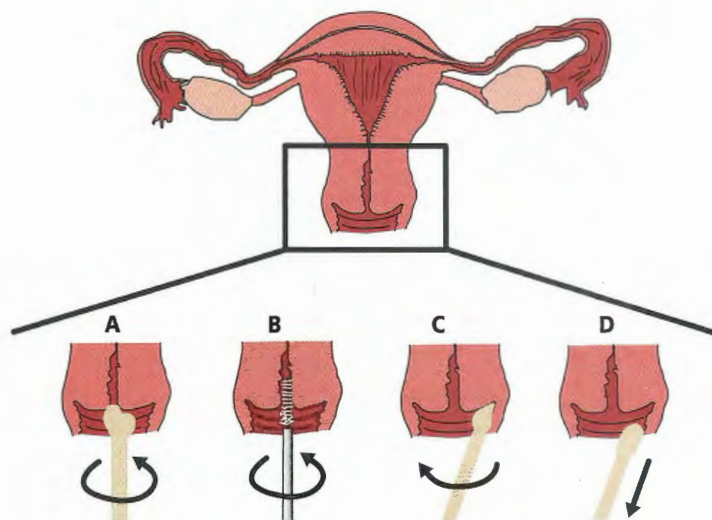



Figura 3.5 – Esquema representativo de coleta cérvico-vaginal. (*A*) Posicionamento do braço alongado da espátula de Ayre no orifício externo do colo e rotação de 360°. (*B*) Introdução da escova no canal endocervical e rotação de 360°. (*C*) Raspagem do fundo de saco com a extremidade arredondada da espátula de Ayre. (*D*) Raspagem do terço superior da parede lateral da vagina com a extremidade arredondada da espátula de Ayre.

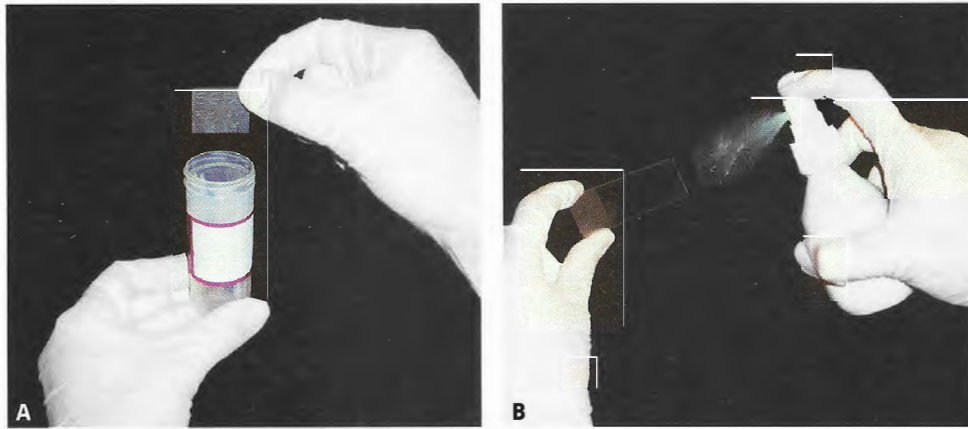



Figura 3.6 – Foto representativa das duas formas de fixação do esfregaço cérvico-vaginal. (*A*) Imersão em álcool com concentração entre 70% e 95% e (*B*) *spray* de propilenoglicol. A fixação adequada deve ocorrer imediatamente após a confecção do esfregaço. No caso de fixação com *spray*, deve-se respeitar uma distância mínima de 15 e máxima de 30 cm.

mente. O material coletado deve ser estendido em toda a extensão da lâmina de maneira uniforme, com suave pressão, e imediatamente fixado (Figura 3.6).

- Para a coleta na ectocérvice, encaixar a ponta mais longa da espátula de Ayre no orifício externo do colo, apoiando firmemente, fazendo uma raspagem na mucosa ectocervical em movimento rotatório de 360°, em torno de todo o orifício, procurando exercer pressão firme, mas delicada, sem agredir o colo, para não prejudicar a qualidade da amostra (Figura 3.5, *A*).
- Para a coleta endocervical, introduzir a escova tipo Cytobrush no orifício cervical e recolher o material, girando-a delicadamente a 360° (Figura 3.5, *B*). A escova deve ser rolada pela lâmina com suave pressão para deposição do material de forma homogênea, em sentido distinto do esfregaço ectocervical.
- Realizar a fixação celular imediatamente após a confecção do esfregaço (Figura 3.6).
- Acondicionar a lâmina em recipiente de transporte adequado (Figura 3.7) e identificado com o nome completo da paciente e a data da coleta.

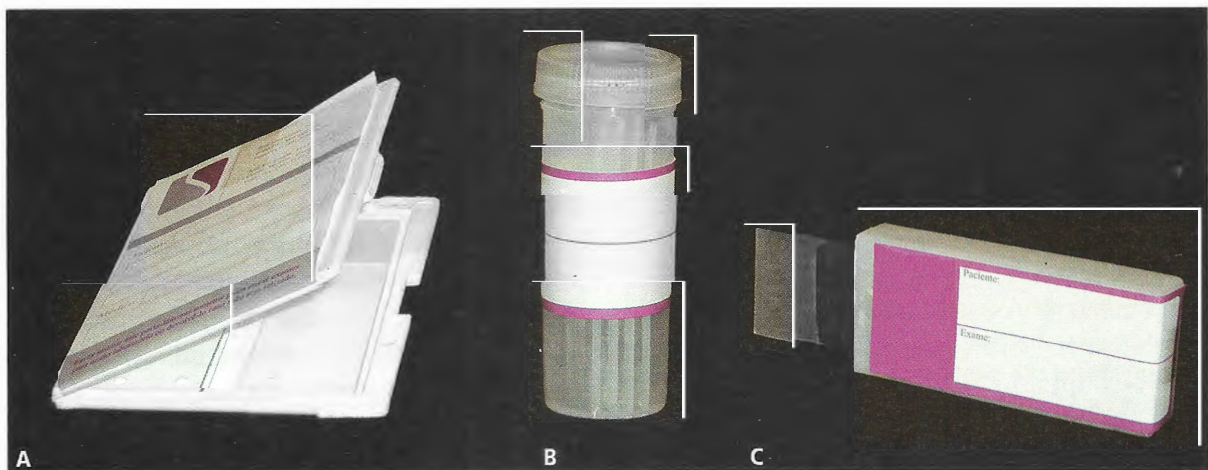



Figura 3.7 – O acondicionamento e o transporte da amostra deverão ser feitos em porta-lâminas, se fixação em *spray* (*A*) ou (*C*), ou ela deve ser imergida em frasco com álcool (*B*). É fundamental que o recipiente de transporte esteja identificado e que a identificação seja coincidente com a lâmina e com o pedido médico.

Fixação dos esfregaços

Após dispersão sobre a lâmina, as amostras devem ser fixadas imediatamente, enquanto molhadas, em etanol por, pelo menos, 15 min ou por um *spray* fixador (Figura 3.6). É desejável que a fixação ocorra em um tempo menor do que 10 s após a coleta, visando preservar a morfologia celular, suas afinidades tintoriais, facilitar a permeabilidade dos corantes nas células e preservar contra ressecamento[4].

Os fixadores mais utilizados são álcool etílico ou equivalentes, em uma graduação que pode variar entre 70% e 95%, e solução alcoólica de polietilenoglicol a 2%. A fixação em álcool é feita por imersão; a fixação com solução de polietilenoglicol pode ser feita em gotas ou *spray*. Se a solução é *spray*, deve-se respeitar uma distância mínima de 15 cm, para evitar dispersão, sobreposição e/ou perda de material celular, e máxima de 30 cm, para que ocorra fixação adequada. Nessas soluções, o álcool atua como fixador, desnaturando as proteínas e os ácidos nucleicos, tornando-os insolúveis e estáveis. A solução de polietilenoglicol promove a formação de um filme opaco sobre a lâmina, impedindo o ressecamento do material.

Quadro 3.1 – Fatores que interferem na adequabilidade da amostra citológica

- Falta de colaboração da paciente (constrangimento)
- Patologia vulvar
- Tratamento abrasivo prévio
- Processo inflamatório intenso
- Vaginismo
- Obesidade
- Condição hormonal
- Anatomia do óstio da cérvice uterina
- Anatomia do útero
- Posicionamento da cérvice uterina
- Habilidade do profissional
- Lâminas e frascos não identificados ou classificados incorretamente
- Fixação inadequada da amostra
- Coleta durante o período menstrual ou com sangramento excessivo decorrente de patologia
- Escassez de material
- Não realização de coleta endocervical

Quadro 3.2 – Fatores que indicam a qualidade da amostra

- Presença de informes clínicos anexados à amostra
- Identificação das lâminas antes de iniciar a coleta
- Esfregaço realizado na face da lâmina que contém a extremidade fosca
- Esfregaço ocupando toda a superfície transparente da lâmina
- Acondicionamento apropriado das lâminas
- Tipos de células presentes no esfregaço
- Separação nítida entre coleta ecto e endocervical
- Quantidade adequada de células no esfregaço
- Espessura e homogeneidade do esfregaço
- Preservação das estruturas celulares

978-85-4120-024-0

Os fatores que interferem na adequabilidade da amostra e os que indicam a qualidade dela são descritos nos Quadros 3.1 e 3.2, respectivamente.

Citologia hormonal isolada e citologia hormonal seriada

A vagina e o colo do útero são revestidos por epitélio escamoso, que, como descrito anteriormente, é estratificado, possuindo camadas de células sobrepostas. Estas se descamam espontaneamente conforme sua maturidade, por contato físico, degeneração, redução da espessura do epitélio decorrente de processos inflamatórios ou outros fatores. A maturação ou a diferenciação celular ocorre em decorrência de estímulos hormonais ovários, ou seja, é um epitélio hormônio-dependente. Assim, é possível, mediante sua análise celular, obter de forma indireta uma avaliação da ação dos hormônios femininos (ver detalhes no Capítulo 2).

Para essa avaliação, as amostras coletadas diferenciam-se quanto ao número e ao objetivo específico. Na citologia hormonal isolada, coleta-se amostra única da parede lateral da vagina. Ela é indicada para a avaliação da ação hormonal de crianças e pré-púberes com características clínicas sugestivas de início precoce da puberdade, pacientes com TRH, climatéricas e menopausadas, para avaliação da possível atrofia ou resposta à terapia hormonal.

Na citologia hormonal seriada, são coletadas quatro amostras em um mesmo ciclo menstrual:

no 7º, no 14º, no 21º e no 28º dia. É desejável que essas amostras sejam coletadas após a ocorrência de dois ciclos regulares consecutivos, quando a situação hormonal da paciente possibilitar. O exame também poderá ser realizado com o mínimo de três amostras, conforme solicitação médica. O objetivo desse exame é a avaliação indireta do período ovulatório para auxílio no tratamento de fertilização. É de fundamental importância que sejam informadas as datas do início do ciclo e das respectivas coletas para as corretas interpretações hormonais. Detalhes quanto às interpretações dos esfregaços destinados à citologia hormonal são descritos no Capítulo 2.

Para a avaliação hormonal, realizar o raspado da parede lateral da vagina, no seu terço superior, com a parte arredondada da espátula de Ayre (Figura 3.5, *D*). Obter a amostra realizando apoio firme na borda lateral da espátula contra uma das paredes laterais da vagina, com movimentos de baixo para cima, vagarosamente. Todos os demais passos da confecção e da fixação dos esfregaços devem ser realizados como descrito anteriormente.

Ainda para a citologia hormonal, a coleta do material e o preparo do esfregaço podem ser realizados por meio da técnica de urocitograma, procedimento citológico no qual a avaliação das células escamosas é realizada em esfregaços confeccionados a partir dos sedimentos urinários[1,5]. Essa técnica fundamenta-se no fato de algumas células epiteliais descamadas do organismo humano, como as do trígono vesical, da uretra, da conjuntiva ocular e das mucosas bucal e nasal, responderem de forma satisfatória às variações dos hormônios sexuais de modo semelhante ao epitélio estratificado escamoso não queratinizado da ectocérvice e da vagina[5]. O trígono vesical e a uretra, mais especificamente, possuem ilhotas de epitélio estratificado escamoso semelhante ao vaginal, com reatividade aos hormônios ováricos e tendência a descamação das células das camadas mais exteriores[5,6], possibilitando conhecer o estado e as variações hormonais de uma paciente.

As indicações clínicas são as mesmas da citologia hormonal vaginal, com a principal vantagem de facilidade na coleta, sem a necessidade de exame ginecológico, além de possibilitar a obtenção de amostras seriadas. Esse método é utilizado, principalmente, quando existe impossibilidade na obtenção de esfregaços vaginais, como na infância e na adolescência, nas virgens, nas grávidas com ameaça de aborto, em enfermas impossibilitadas de locomoção e em mulheres com infecção vaginal, o que inviabiliza a avaliação hormonal vaginal. As desvantagens são escassa quantidade de células descamadas, alterações celulares menos evidentes e células pouco preservadas e interferentes presentes na urina[1,5].

Os procedimentos básicos para a realização do urocitograma são concentração do material (urina), geralmente por centrifugação; retirada de interferentes (proteínas e cristais) mediante centrifugação do sedimento urinário com solução de Ringer; fixação dos esfregaços com álcool ou polietilenoglicol e coloração dos esfregaços (Papanicolaou ou Shorr).

Para a avaliação hormonal seriada, o urocitograma deve ser realizado com o mesmo número de coletas e nos mesmos dias que o estabelecido para a coleta vaginal, como descrito anteriormente.

PROCESSAMENTO E RASTREAMENTO

Após a coleta da amostra cérvico-vaginal, as etapas de processamento que ocorrem dentro do laboratório de citologia podem ser didaticamente divididas em três fases (pré-analítica, analítica e pós-analítica [Quadro 3.3] – ver detalhes no Capítulo 13), descritas brevemente a seguir.

Fase pré-analítica

Inclui as etapas de recepção do material, conferência das identificações da amostra, cadastramento e processamento técnico. Todas as etapas deverão ser cumpridas sob rigoroso controle de qualidade (ver detalhes no Capítulo 13). Qualquer inconformidade nos dados resultará em erros que dificultarão ou impossibilitarão as etapas seguintes.

Quadro 3.3 – Divisão esquemática das fases do processamento da amostra cérvico-vaginal no laboratório de citologia

- Fase pré-analítica:
  - Recepção do material citológico
  - Identificação da amostra
  - Cadastramento
  - Processamento técnico
- Fase analítica:
  - Microscopia
  - Discussão e revisão de casos
  - Diagnóstico
- Fase pós-analítica:
  - Digitação do diagnóstico
  - Conferência e assinatura do laudo
  - Encaminhamento aos consultórios
  - Arquivamento do pedido médico e da lâmina

Recepção e identificação do material

Após a recepção do material pelo laboratório, deverá ocorrer a primeira verificação da adequabilidade da amostra. Amostras não fixadas, lâminas quebradas, ausência ou erro na identificação são alguns motivos pelos quais o material pode ser rejeitado e devolvido ao local de realização da coleta.

Após essa primeira triagem, a lâmina e o pedido médico deverão ser anexados e identificados para controle interno do laboratório, para então serem encaminhados para o processamento técnico.

Processamento técnico

A coloração dos esfregaços citológicos pode ser realizada pelas técnicas de Papanicolaou ou Shorr, que são colorações policrômicas, ou seja, empregam vários corantes, permitindo a diferenciação das células em cianófilas e/ou eosinófilas.

A coloração de Papanicolaou é utilizada pela maioria dos laboratórios de citologia, sendo referência mundial. Ela é constituída por etapas de coloração do núcleo e do citoplasma, fases de desidratação, hidratação e diafanização que serão discutidas a seguir. Essa bateria de coloração pode ser constituída por 12 a 17 cubas, de acordo com as adaptações realizadas em cada serviço. Essas adaptações, apesar de permitidas, devem sempre manter o objetivo principal, que é a coloração adequada do núcleo e dos componentes citoplasmáticos, sendo também capaz de indicar a maturidade celular[4].

O mecanismo pelo qual as células são coradas ainda não é completamente entendido, mas são importantes a adsorção e as características de afinidades químicas na coloração. Para ambos, a concentração de corantes nas soluções e a forma iônica sob as quais se encontram são determinantes. As estruturas celulares ácidas tendem a atrair cátions, tanto por adsorção como em reações químicas, e as estruturas celulares básicas atraem os radicais aniônicos dos corantes. O citoplasma, sendo formado por estruturas ácidas e básicas, atrairia combinações de corantes, ao passo que o núcleo celular, possuindo ácidos nucleicos, seria predominantemente ácido[7,8].

A hematoxilina é um corante básico de solução aquosa corando estruturas ácidas (basofílicas/cianófilas) interagindo com os ácidos nucleicos, mais especificamente com moléculas de fosfatos ligadas ao DNA, resultando em uma coloração azul-escura do núcleo celular. Possui afinidade por parede celular de lactobacilos e outras bactérias que podem estar presentes nos esfregaços e reage sutilmente com o citoplasma das células escamosas[4].

O *orange* G é um corante ácido de base alcoólica com dois grupamentos sulfônicos, corando componentes básicos (acidófilos/eosinofílicos) do citoplasma das células escamosas maduras (diferenciadas) de amarelo ou alaranjado, incluindo proteínas pré-queratínicas das células superficiais eosinofílicas. Cora parcialmente hifas fúngicas[4].

O EA é um corante de base alcoólica, com afinidade por estruturas basofílicas/ácidas (cianofílicas) e acidófilas/básicas (eosinofílicas). A finalidade é a coloração de grânulos oxifílicos do citoplasma de células escamosas menos maduras e de células glandulares, além de corar o citoplasma de *Trichomonas vaginalis*. Na verdade, é uma mistura de corantes, cujas soluções apresentam formulações similares, compostas de solução alcoólica de verde luz ou *light green* (corante básico), pardo Bismark (corante básico) e eosina Y (corante ácido policrômico, tetrabromo fluoresceína), não produzindo sobreposição de cores. EA-36 e EA-65 variam entre si apenas na

concentração do corante verde-luz, que, na solução EA-36, é maior em 50% do que na solução corante EA-65[4].

Os objetivos da coloração de Papanicolaou são:

- Permitir a definição de detalhes estruturais do núcleo.
- Determinar transparência celular, obtida com a passagem dos esfregaços em várias cubas com álcool em diferentes concentrações e pelo álcool etílico presente nos corantes EA e *orange*-G.
- Diferenciar os elementos celulares cianófilos e eosinófilos, permitindo a melhor identificação de determinados tipos celulares.

A coloração de Papanicolaou é composta de uma sequência de três soluções corantes e fases de hidratação, desidratação e diafanização da amostra[2,4], como a seguir:

- Hidratação: processo no qual o material citológico é hidratado em banho de água corrente para facilitar a interação com o primeiro corante, que é de base aquosa.
- Coloração com hematoxilina.
- Desidratação: processo realizado pela imersão do material citológico em concentrações crescentes de álcool para que as células compatibilizem-se com o próximo corante, que é de base alcoólica. Além disso, a desidratação elimina traços de água que poderiam prejudicar a transparência da preparação pela formação de gotas opalescentes. A passagem por esses álcoois também auxilia na remoção do excesso de hematoxilina.
- Coloração com *orange* G.
- Coloração com EA-36 ou EA-65.
- Diafanização: nessa etapa, é fundamental que o material seja intensamente desidratado. Esse processo é realizado por imersão em xilol, um agente clarificante e solvente que diminui a opacificação das células, criando uma condição de transparência necessária para a visualização de detalhes celulares.
- Montagem das lâminas com meio de montagem (bálsamo do canadá sintético) ou verniz automotivo.

A coloração de Shorr, acrescida de uma etapa com a hematoxilina de Harris, é genericamente denominada coloração de Harris-Shorr ou Shorr modificado. Apesar da coloração de Papanicolaou ser universalmente a coloração mais utilizada na citologia clínica, em vários serviços brasileiros a coloração de Shorr modificado é uma opção como coloração alternativa[9].

Assim como na coloração de Papanicolaou, a coloração de Shorr modificado (Pundell) é composta de uma fase de coloração do núcleo, promovida pela hematoxilina, e uma única fase para coloração do citoplasma, feita pelo corante de Shorr, que originalmente era usado para avaliação hormonal por sua sensibilidade em corar e representar a maturidade celular. Possui também as fases de hidratação, desidratação e diafanização, mas sua bateria, em comparação com a de Papanicolaou, é menor, entre 7 e 9 cubas. Consequentemente, o custo e o tempo para realização do processo são menores e atende as expectativas das características morfotintorias[9].

Tabela 3.1 – Técnica de coloração de Papanicolaou (modificado)

Etapa	Tempo
Álcool etílico	1 min
Água destilada	1 min
Hematoxilina de Harris	1 a 3 min
Água destilada	1 min
Diferenciação em álcool acidificado (1% de ácido clorídrico em álcool etílico a 95%)	Cerca de 1 min
Água corrente	5 min
Álcool etílico a 70%	Imergir
Álcool etílico a 95%	Imergir
Álcool etílico absoluto	Imergir
Orange G	2 min
Álcool etílico absoluto	Imergir
Álcool etílico absoluto	Imergir
Álcool etílico absoluto	Imergir
EA-65	3 min
Álcool etílico a 95%	Imergir
Álcool etílico absoluto	Imergir
Álcool etílico absoluto	Imergir
*Xylol (3 banhos consecutivos)	1 min
Montar com meio de montagem entre lâmina e lamínula	

* O xilol pode ser substituído por secagem em estufa (20 min) a 60°C.

Tabela 3.2 – Técnica de coloração de Harris-Shorr (Pundel)

Álcool etílico a 70%	Imergir
Água destilada	Imergir
Hematoxilina de Harris	1 a 3 min
Quando ocorrer hipercoloração, diferenciar em uma solução aquosa de ácido clorídrico a 1%	
Água corrente	5 min
Álcool a 95%	Imergir
Corante de Shorr	1 a 3 min
Álcool etílico a 95%	Imergir
Álcool etílico a 95%	Imergir
Álcool etílico absoluto	Imergir
*Xilol	Imergir
*Xilol	Imergir
*Xilol	Repousar
Montar com meio de montagem entre lâmina e lamínula	

* O xilol pode ser substituído por secagem em estufa (20 min) a 60°C.

A estabilidade do corante Shorr é maior do que as soluções corantes da coloração de Papanicolaou, tendo assim maior durabilidade, resultando na redução de custo do processo. A coloração de Shorr é indicada, principalmente, para serviços com grande volume de rotina.

O xilol utilizado nas colorações citológicas alternativamente poderá ser substituído por secagem em estufa por 20 min a 60°C, procedimento igualmente eficiente no processo de desidratação. Existem inúmeras vantagens na retirada do xilol da bateria de coloração, como a preservação do ambiente, a diminuição de exposição à substância tóxica, a desoneração do laboratório na aquisição e no descarte desse componente químico, entre outras.

As Tabelas 3.1 e 3.2 descrevem os procedimentos técnicos das colorações de Papanicolaou e Harris-Shorr, respectivamente.

Fase analítica

Consiste na microscopia para interpretação dos quadros citológicos, discussão, revisão de casos e diagnóstico. O citologista é o profissional responsável por essa etapa, podendo trabalhar sozinho ou em equipe. Quando trabalha só, deve sempre relacionar-se com profissionais de outros serviços, laboratórios de apoio e entidades de classe ligadas à citologia e aos controles externos de qualidade, como garantia de qualidade de seus serviços.

Na fase analítica, existem, resumidamente, os seguintes procedimentos:

- Conferir o pedido médico e a anamnese com a lâmina.
- Leitura da lâmina/interpretação.
- Emitir um diagnóstico ou impressão diagnóstica com base na nomenclatura brasileira para laudos citológicos.
- Avaliar a coleta e o processamento técnico paralelamente à interpretação microscópica.
- Marcar campos suspeitos para posterior revisão e discussão do caso, quando necessário.
- Encaminhar diagnóstico para o setor de emissão de laudos.
- Separar lâminas para o controle de qualidade interno/externo.
- Encaminhar lâminas para o arquivamento.
- Encaminhar casos para a revisão e revisar/avaliar casos de outros profissionais.

Rastreamento

Após o processamento técnico, a leitura da lâmina deve seguir regras bem-estabelecidas. Com a lâmina identificada e acompanhada dos informes clínicos, verificar a existência de exames anteriores e, se existentes, anexá-los ao pedido atual. O exame microscópico é realizado com objetiva de 10× e oculares de 10× ou 15×. Células ou regiões atípicas que merecem avaliação mais minuciosa devem ser avaliadas com a objetiva de 40×.

A varredura da lâmina deve avaliar todos os campos do esfregaço, não existindo consenso quanto ao sentido de varredura na lâmina, podendo ocorrer no sentido vertical ou horizontal (Figura 3.8). Deve ser sistematizada para evitar a falta de visualização de qualquer campo do esfregaço. Sendo assim, deve-se realizar a leitura de parte do campo anteriormente lido. Portanto, o campo de leitura avaliado imprescindivelmente deve estar intersectado com o anterior.

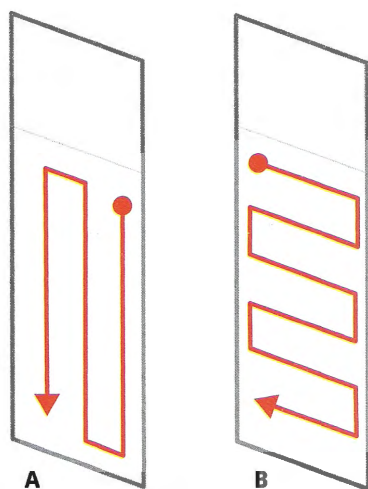



Figura 3.8 – A leitura da lâmina deverá ser sistematizada com rigorosa sobreposição dos campos observados, avaliando toda a área da lâmina. A varredura poderá ocorrer em sentido vertical (*A*) ou horizontal (*B*).

O sistema de Bethesda (ver detalhes no Capítulo 9), revisado em 2001, permite ao citologista avaliar a qualidade técnica da realização do esfregaço, podendo ser classificado como satisfatório ou insatisfatório, o que é de extrema importância, considerando-se que 50% dos casos com citologia falso-negativa são atribuídos a falhas técnicas.

Fase pós-analítica

Caracterizada por ações realizadas após a interpretação da lâmina, é desempenhada por profissionais distintos. A digitação do laudo, a conferência e o encaminhamento dele às pacientes ou aos consultórios são realizados por pessoal de recepção/expedição, devendo o arquivamento do pedido médico e da lâmina ser realizado por um arquivista. O setor de arquivo é muito importante dentro do laboratório de citologia e exige espaço próprio e pessoal devidamente treinado, pois, além de ser fundamental para nortear diagnóstico com exames anteriores, a busca destes propicia uma reavaliação de casos, promovendo uma educação continuada para a equipe.

A exigência legal de arquivamento de lâminas é de 5 anos para exames negativos, sendo a guarda indeterminada para exames positivos e suspeitos. No entanto, acredita-se não ser de grande valia após 15 anos, pois essas lâminas muito provavelmente não estarão em estado satisfatório de conservação.

A divisão das etapas em um laboratório de citologia utiliza de forma didática a microscopia como referencial, o que não diminui a extrema importância das fases pré e pós-analítica. Pelo contrário, reforça a inter-relação entre elas, a sistemática rigorosa do serviço e os vários profissionais envolvidos nesse processo.

CITOLOGIA DE MEIO LÍQUIDO

Como uma alternativa para o ganho de sensibilidade da citologia diagnóstica, existe o método de citologia em base líquida, que apresenta uma série de vantagens em relação à técnica de coleta convencional, a qual será detalhadamente descrita no Capítulo 4.

Referências

1. KOSS, L. G.; MELAND, M. R. **Koss' Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases**. 5. ed., New York: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
2. GOMPEL, C.; KOSS, G. L. **Citologia Ginecológica e suas Bases Anatomoclínicas**. 1. ed., São Paulo: Manole. 1997. p. 200.
3. CARVALHO, G. **Citologia do Trato Genital Feminino**. 5. ed., Rio de Janeiro: Revinter, 2009. p. 416.
4. BIBBO, M.; WILBUR, D. C. **Comprehensive Cytopathology**. 3. ed., Philadelphia: Elsevier, 2010. p. 1105.
5. AYALA, M. J.; WILSPLANA, E. V.; ORTIZ, F. G. et al. **Citopatologia Ginecológica**. 2. ed., Barcelona: Editorial Científico-Médica, 1985.
6. LENCIONI, L. J.; GARCIA, C. G.; ALONSO, C. A. Efecto del estriol sobrel el urocitograma, colpocitograma y cristalizacion del moco cervical. Argentina: **La Prensa Médica Argentina**, Buenos Aires, 1963.
7. BURTIZ, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Fundamentos de Química Clínica**. 4. ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 1998.
8. GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 1. ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999.
9. STORTI-FILHO A.; ESTIVALET SVIDIZINSKI, T. I.; DA SILVA SOUZA, R. J. et al. Oncotic colpocytology stained with Harris-Shorr in the observation of vaginal micro-organisms. **Diagn. Cytopathol.**, v. 36, n. 6, p. 358-362, 2008.

Capítulo **4**

Novas Metodologias em Citologia Cérvico-Vaginal

Marco Antonio Zonta

INTRODUÇÃO

A importância de melhor identificar as alterações celulares capazes de definir o tipo de lesões precursoras e o câncer de colo uterino é alvo de estudo nos últimos anos. A melhoria da qualidade no preparo das amostras celulares, a partir de uma boa coleta, e o preparo do material celular, capaz de diminuir os interferentes e aumentar a sensibilidade na identificação de alterações celulares, são os grandes objetivos da implantação de novas metodologias[1,2,9,11,17].

A utilização de processos automatizados com o objetivo de facilitar o diagnóstico das alterações nucleares, valorizando os aspectos de hipercromasia nuclear e o contorno da membrana nuclear, bem como a composição da cromatina, permite um diagnóstico mais específico do grau de lesão celular. A melhor definição de forma, tamanho e limites celulares e a visualização de componentes do fundo do esfregaço aumentam ainda mais a sensibilidade diagnóstica do exame[3,4,9].

A implantação da metodologia em meio líquido, associada às novas tecnologias, permitiu a melhora na acurácia e na identificação dessas alterações, além de diminuir, quase na sua totalidade, possíveis interferentes que possam estar presentes nos esfregaços, dificultando a análise da amostra. Essa metodologia permite o preparo de lâminas com maior representatividade celular. A citologia convencional permite o aproveitamento de 20% do material coletado, sendo cerca de 80% do material coletado descartado com os instrumentos de coleta. A metodologia de meio líquido aproveita 100% do material celular coletado, permitindo, ainda, a conservação do material

celular, preservando sua morfologia, evitando o acúmulo de restos celulares, fundo hemorrágico, muco, infiltrado inflamatório e sobreposição das células na lâmina[22].

A utilização dessas técnicas diagnósticas nos programas de prevenção e controle do câncer de colo uterino é eficiente em todo o mundo no rastreamento de lesões precursoras e neoplasias[11, 21].

A utilização dessa metodologia aumenta a sensibilidade do exame citológico em relação à metodologia convencional, diminuindo ainda o grau de inadequação das amostras. Os quadros de atipias de significado indeterminado (ASC-US/H) são, muitas vezes, esclarecidos em razão da maior valorização das características citomorfológicas das células preservadas em meio líquido. Além disso, o material coletado em meio líquido permite ainda maior tempo de conservação celular e utilização deste para diagnósticos moleculares e imunocitoquímicos[1,5,7,15,16,25].

Duas das metodologias mais usadas estão disponíveis no Brasil e são utilizadas para padronização da coleta de material celular em meio líquido e confecção de amostras citológicas capazes de serem analisadas tanto por microscopia óptica como por equipamentos automatizados. São elas: *ThinPrep*® e o *Surepath*®[1,8,9,12,16,17,23]. Essas metodologias têm como objetivo melhorar a qualidade das amostras citológicas, evitando problemas com recoleta e sobreposição celular. Ainda, aumentam a sensibilidade na avaliação celular e proporcionam a análise automatizada.

Coleta de material celular em meio líquido

É realizada com uma escova de cerdas plásticas ou com uma espátula de Ayre plástica capaz de destacar as respectivas cabeças removíveis, utilizadas para a realização do raspado celular (Figura 4.1).

Os instrumentos são introduzidos no canal vaginal até atingir o orifício externo do canal endocervical. A porção alongada da escova é fixada dentro do canal e com dois movimentos de rotação em 360°. As amostras celulares das regiões endocervical, JEC e ectocérvice são coletadas e, em seguida, depositadas no frasco com líquido conservante (Figura 4.2).

Após a coleta, o material é alocado com a cabeça da escova, dentro do recipiente com líquido conservante. A totalidade da amostra celular coletada é mantida em condições ideais para análises citológicas e moleculares (Figura 4.3).

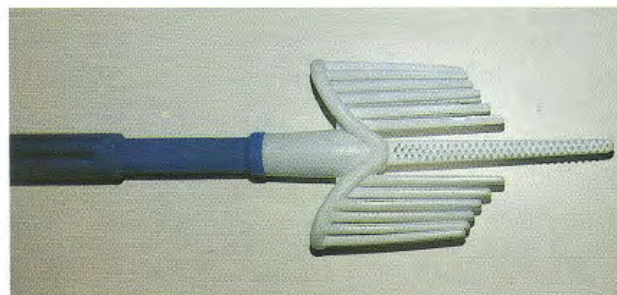



Figura 4.1 – Escova com cerdas plásticas e cabeça destacável.

Figura 4.2 – A figura exibe a sequência de eventos para a coleta de material cérvico-vaginal. Após a introdução da parte afilada da escova no orifício externo do colo uterino, é realizado um movimento de rotação de 360° no sentido horário, por duas vezes.

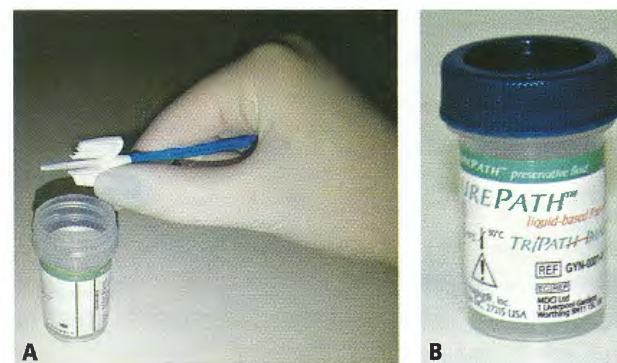



Figura 4.3 – (*A*) Descarte da cabeça da escova de cerdas plásticas no recipiente contendo líquido de preservação celular. (*B*) Frasco conservante SurePath™ contendo material celular, que poderá ser processado ou armazenado.

978-85-4120-024-0

Uma das grandes vantagens dessa metodologia é que a amostra pode ser acondicionada por um período médio de 15 dias em temperatura ambiente, 6 meses refrigerado a 4°C ou até 2 anos congelado a –20°C.

Adequabilidade da amostra citológica

A adequabilidade da amostra é um dos principais fatores que condicionam a realização correta do exame de citologia cérvico-vaginal. A representação celular das regiões de ectocérvice, JEC e canal endocervical permite a completa avaliação das possíveis alterações celulares que acometem essas regiões, responsáveis pelo desenvolvimento e pela evolução do câncer do colo uterino em 99% dos casos[5,6,13,14].

A coleta eficiente permite um número celular capaz de fazer um diagnóstico citológico seguro, assegurando uma boa avaliação das amostras e diminuindo a ocorrência de falso-negativos, tendo em vista o aproveitamento total da amostra coletada.

Bigras *et al.*[4] verificaram, em um estudo comparativo, que 37% do material coletado pelo método convencional era perdido, comparado ao aproveitamento total das amostras coletadas em meio líquido. Assim, eles concluíram que o descarte do material de coleta convencional é uma das causas de falha da técnica, em razão da perda de material celular rico potencialmente alterado.

Fremont-Smith *et al.*[8] realizaram um estudo prospectivo com 58.580 amostras citológicas cérvico-vaginais coletadas pelo método SurePath® e evidenciaram o aumento de 64% de sensibilidade na detecção de lesões intraepiteliais escamosas de baixo e alto graus em relação às amostras coletadas pelo método convencional.

As amostras consideradas satisfatórias são aquelas que apresentam cerca de 5.000 células escamosas bem-preservadas e bem-distribuídas, de forma homogênea na lâmina, para que se possa realizar a análise tanto por microscopia óptica como pelo método automatizado, quantidade mínima de células recomendada para a leitura automatizada. A avaliação da zona de transformação e do canal endocervical torna-se viável com a presença de 10 células distribuídas no esfregaço.

A metodologia é capaz de diminuir interferentes, como, por exemplo, o excesso de muco, restos celulares, exsudato inflamatório intenso, hemácias e outros interferentes como espermatozoides e artefatos capazes de mascarar os achados citológicos.

Sweeney *et al.*[22] realizaram um estudo comparativo, no qual verificaram a efetividade da utilização da metodologia em meio líquido na diminuição de interferentes no esfregaço. O estudo demonstrou ser eficaz na diminuição dos interferentes, pois a metodologia apresenta uma etapa de purificação e enriquecimento da amostra, evitando sobreposição entre as células e o acúmulo de *debris* celulares capazes de interferir na observação das estruturas.

Preparo de amostras em meio líquido

A metodologia em meio líquido permite a maior distribuição das células na lâmina. Essa composição celular é obtida após um processo de homogeneização (Vortex) das células, conservadas no frasco, e um processo de enriquecimento, permitindo o aumento da concentração celular por centrifugação.

Ao depósito das células (*pellet*) é adicionado um líquido conservante, capaz de manter a integridade celular, e o material é fixado em uma lâmina especial com carga elétrica capaz de promover maior fixação. Na sequência, a amostra é submetida à coloração de Papanicolaou, realizada por métodos automatizados (Figura 4.4).

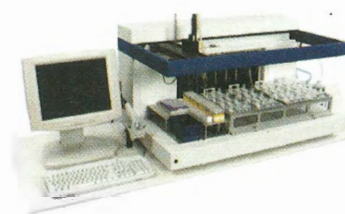



Figura 4.4 – Equipamento PrepStain utilizado para coloração automatizada de Papanicolaou de amostras celulares coletadas em meio líquido.

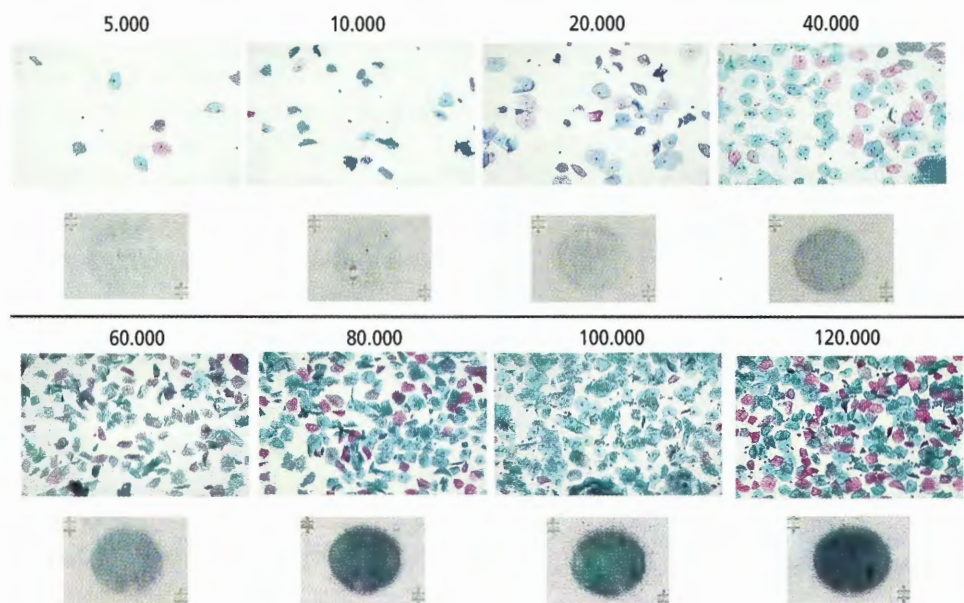



Figura 4.5 – A figura exibe uma sequência de material celular em ordem crescente de quantidade, evidenciando a disposição das células no esfregaço e seus respectivos esfregaços padronizados pelo método automático.

A quantidade celular é fator determinante na avaliação das amostras. Esfregaços com baixa celularidade são considerados insatisfatórios para avaliação. Em contrapartida, o excesso de células pode promover sobreposição e prejudicar a identificação de alterações celulares com características de lesão (Figura 4.5).

Critérios celulares para identificação de lesões

Esfregaços normotróficos

As amostras satisfatórias coletadas em meio líquido apresentam excelente disposição na lâmina. Normalmente estão dispostas de forma isolada, com limites bem-definidos e raramente estão sobrepostas. Os limites nucleares estão igualmente bem-definidos e a cromatina apresenta distribuição regular[3,6,13].

As células glandulares podem manter o padrão em "favo de mel" com citoplasma basofílico e núcleos redondos bem-definidos e uniformes em tamanho e forma. Esses núcleos exibem hipercromia leve e cromatina regularmente distribuída (Figura 4.6, *A*).

Os esfregaços que apresentam células epiteliais com alterações reativas exibem características inflamatórias evidentes. Os núcleos das células exibem aumento uniforme em volume, com membrana nuclear apresentando contornos regulares. A cromatina apresenta-se bem-distribuída e levemente hipercorada; pequenos grumos podem ser observados. O citoplasma apresenta limites bem-definidos, exibindo alterações em suas bordas, como diminuição da intensidade de coloração. Agentes infecciosos, quando presentes, também apresentam características bem evidentes e de fácil identificação, valorizando as alterações inflamatórias das células (Figura 4.6, *B*)[6,14].

LSIL e HSIL

A identificação de lesões precursoras nos esfregaços cérvico-vaginais é de grande importância na prevenção e no tratamento do câncer genital. A valorização das características nucleares, bem como a sua fácil caracterização nas amostras coletadas em meio líquido, permite um diagnóstico seguro[19].

As LSIL apresentam células escamosas maduras com núcleo exibindo discariose leve e citoplasma abundante e bem-delimitado. A forma

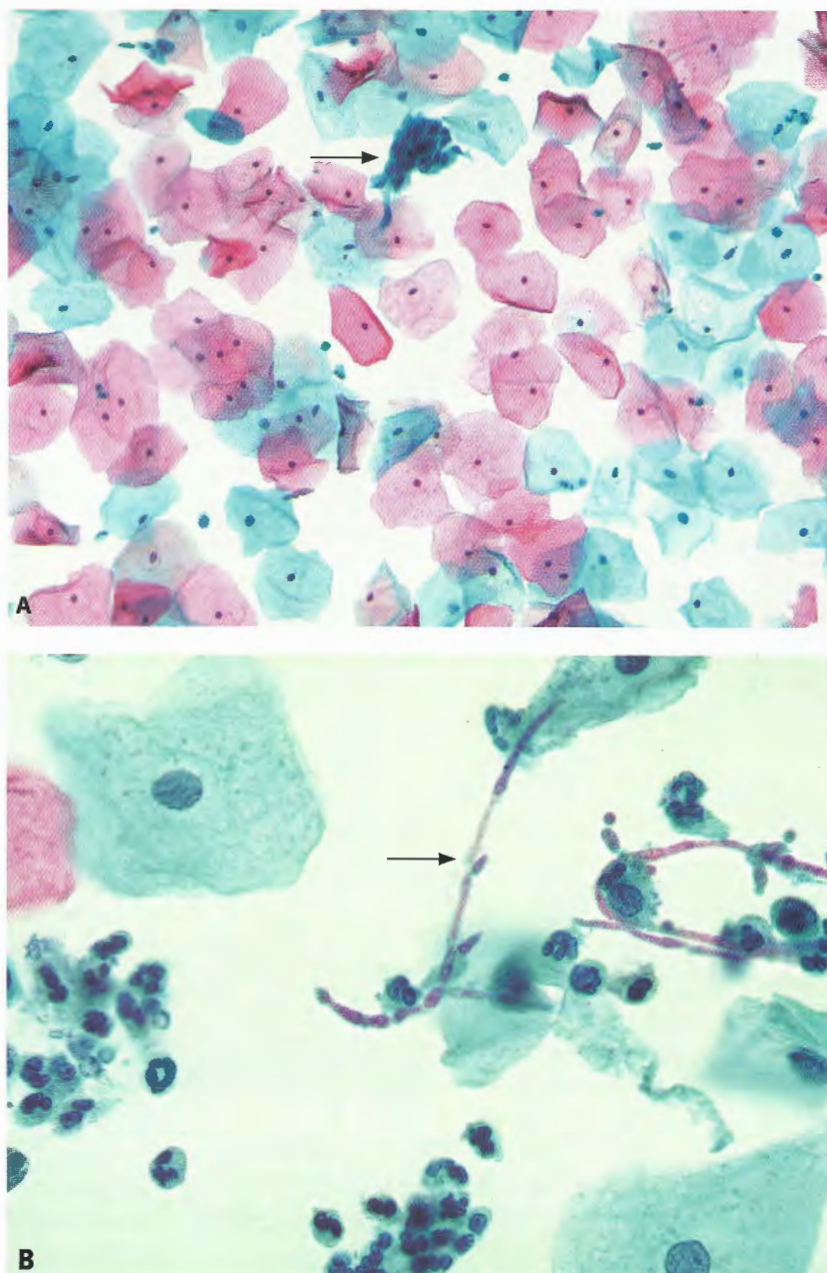



Figura 4.6 – (*A*) A figura exibe células escamosas e glandulares (*seta*) dentro dos padrões de normalidade, representando um esfregaço adequado. (*B*) A figura exibe células escamosas com alterações celulares compatíveis com inflamação e uma pseudo-hifa, sugerindo infecção por fungo (*seta*).

mais comum de evidenciar a ocorrência dessas lesões é a identificação do coilócito nos esfregaços (Figura 4.7, *A*). Essas células são caracterizadas pela ocorrência de discariose leve, com núcleo apresentando contorno levemente irregular e hipercromia leve com cromatina bem-distribuída. No citoplasma, observa-se um halo perinuclear proeminente, deslocando parte do citosol para a periferia do citoplasma. Os limites celulares estão bem-definidos e, normalmente, observa-se um fundo do esfregaço limpo.

Os critérios para identificação das modificações celulares foram bem-descritos no estudo realizado por Yamamoto *et al.*[24], critérios esses que se tornam evidentes e mais seguros para classificá-los quando detectados em esfregaços preparados em meio líquido.

As células com HSIL evidenciam discariose moderada a grave em células imaturas (Figura 4.7, *B*), normalmente dispostas nas camadas profundas do epitélio escamoso e da JEC. O núcleo dessas células é hipercorado, a cromatina

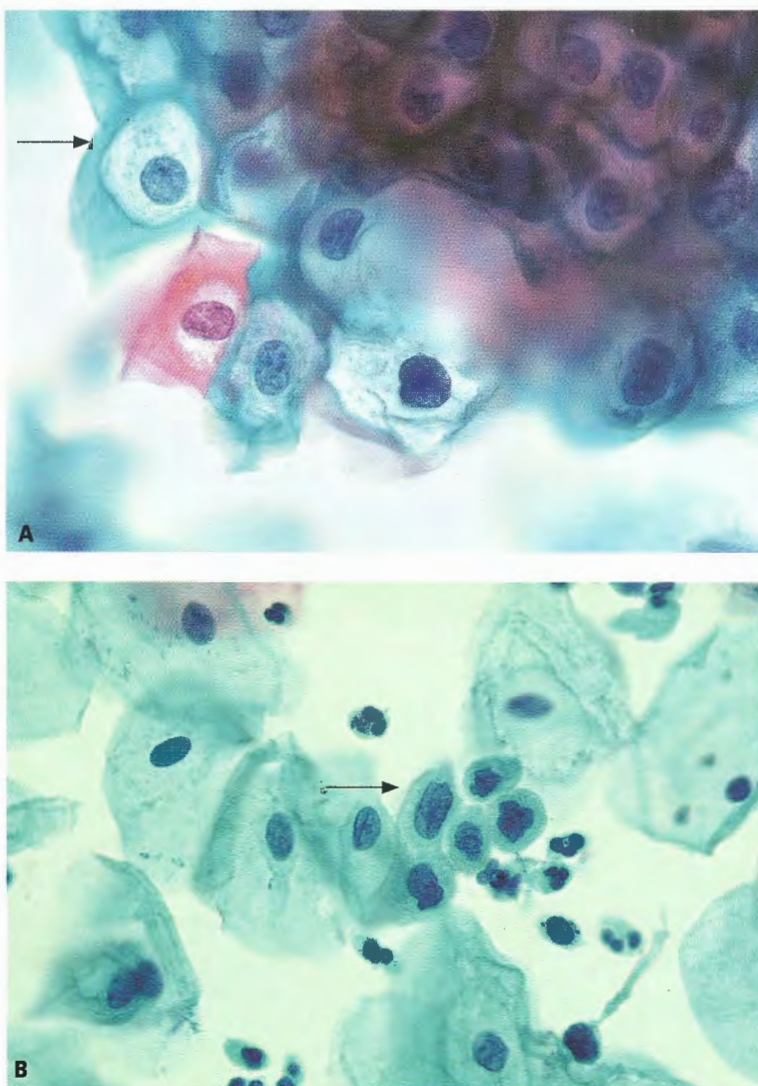



Figura 4.7 – (*A*) A figura exibe um quadro de LSIL evidenciando a presença de coilócitos (*seta*) e discariose leve em células escamosas maduras. (*B*) A figura exibe células escamosas imaturas (*seta*) apresentando discariose moderada, caracterizando um quadro citológico de HSIL.

tende a formar grumos e depositar na membrana nuclear, havendo uma nítida diferenciação da relação núcleo/citoplasma. A membrana nuclear evidencia deformidades em seu contorno e diferentes formas. O citoplasma apresenta limites bem-definidos, ora bem preservados, caracterizando a origem escamosa das células. Essas células podem estar dispostas de forma agrupada ou isolada[23].

Longatto Filho *et al.*[15] realizaram um estudo comparativo para avaliar a sensibilidade no diagnóstico citológico pelo meio líquido comparado ao exame histopatológico em caso de lesões de alto grau, obtendo-se sensibilidade de 91,3% nos achados citológicos quando comparados aos histopatológicos.

As ASC-US e as ASC-H representam um grande problema no diagnóstico citopatológico. Essas atipias geralmente apresentam modificações na morfologia celular, incapazes de determinar, com segurança, o tipo de lesão.

Um estudo realizado por Shidham *et al.*[20] verificou que, com a aplicação do método em meio líquido (SurePath®), consegue-se ter maior clareza no diagnóstico citológico das lesões classificadas como LSIL e ASC-H, sugerindo inclusive a criação de uma nova categoria (LSIL-H) que pudesse caracterizar morfologicamente a intensidade das alterações celulares presentes nos casos duvidosos.

Outro estudo comparativo entre a eficácia da citologia convencional e a da realizada em meio

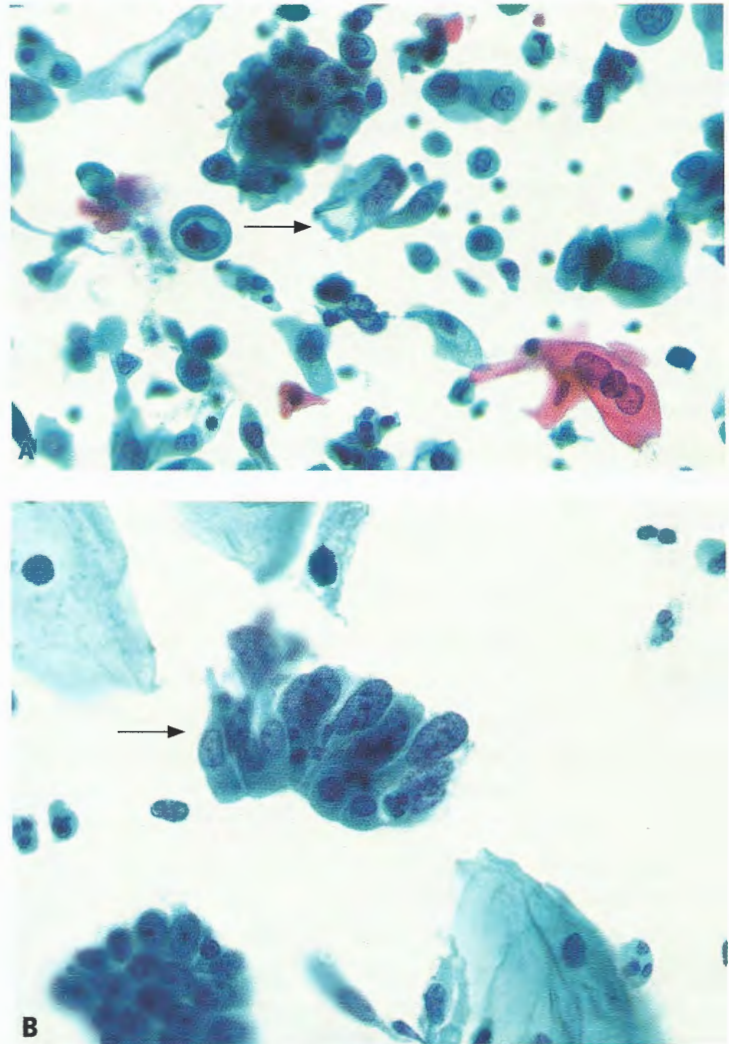



Figura 4.8 – (*A*) Células neoplásicas de origem escamosa evidenciando anisocitose e anisocariose. Células alongadas com núcleos cariomegálicos (*seta*). Observa-se um grupamento celular evidenciando sobreposição. (*B*) A figura exibe um quadro de adenocarcinoma *in situ* evidenciando anisocitose e cariomegalia, os núcleos apresentam contornos irregulares e condensação de cromatina. As células apresentam-se na formação de pseudoestratificação (*seta*).

líquido (DNACitoliq, da Digene Brasil, descontinuado recentemente), realizado por Alves *et al.*[1], verificou que, de 3.206 casos coletados em paralelo, 288 exibiram diagnósticos divergentes. As amostras preparadas pelo meio líquido apresentaram sensibilidade de 85% para definição de lesões, ao passo que as amostras convencionais apresentaram sensibilidade de 62%.

Neoplasia escamosa e glandular de colo uterino em meio líquido

A identificação de células neoplásicas em esfregaços cérvico-vaginais é de fundamental importância no combate da doença. A caracterização desses tipos celulares é crucial para a identificação do tipo de neoplasia[25,26].

As células neoplásicas de origem escamosa exibem alterações morfológicas evidentes, permitindo um diagnóstico seguro.

A visualização de formas bizarras, com núcleos desorganizados, marca a forma maligna da doença. As células exibem anisocitose com núcleos hipercorados, contendo quantidade de cromatina capaz de se depositar na membrana nuclear, que apresenta contornos e formas irregulares, podendo-se observar macronucléolos (Figura 4.8, *A*). Multinucleação e núcleos malignos com cromatina condensada são frequentemente observados nesses casos. Os limites celulares podem estar prejudicados em virtude da formação de agrupamento de células que, ao se sobreporem, dificultam a identificação delas; porém, em meio líquido, normalmente as células neoplásicas apa-

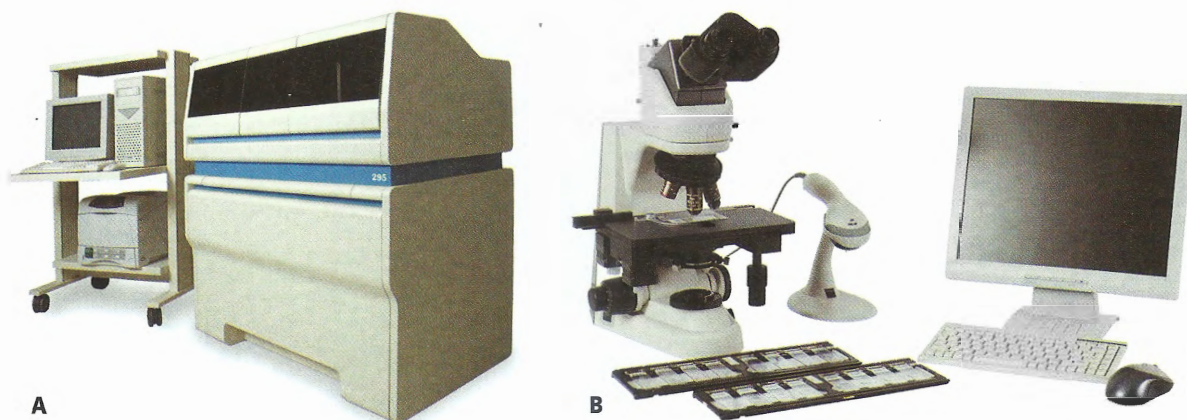



Figura 4.9 – (*A*) Equipamento Focal Point™ Slide Profiler, automação na análise primária de esfregaços cérvico-vaginais coletados em meio líquido. (*B*) Focal Point™GS Imaging System, sistema automatizado para captura de imagens e diagnóstico microscópico de amostras citológicas.

recem isoladas, permitindo uma maior definição de suas formas e tamanhos. O fundo do esfregaço, eventualmente, não exibe características como diátese hemorrágica e restos celulares, muitas vezes dificultando a caracterização da neoplasia para observadores neófitos[6,9].

As neoplasias de origem glandular, adenocarcinomas, apresentam uma melhor caracterização em amostras coletadas em meio líquido. A definição de limites e contornos permite uma maior sensibilidade no diagnóstico das neoplasias.

As células glandulares, nessa metodologia, podem manter ou não sua disposição em "favo de mel", porém é frequente observar sua presença isolada tanto na forma cúbica como na cilíndrica[5,6,14].

As células neoplásicas de origem glandular apresentam anisocariose, com núcleos exibindo contornos irregulares e alongados, cromatina densa, formando grumos e, eventualmente, depositando-se na membrana nuclear. A membrana, por sua vez, exibe irregularidade e está disposta de forma alongada. Macronucléolos podem ser observados. As células podem estar dispostas em grupos, sobrepostas, ou na forma de pseudoestratificação (Figura 4.8, *B*).

Automatização da citologia cérvico-vaginal

A padronização da coleta cérvico-vaginal em meio líquido permitiu o desenvolvimento de métodos automatizados para avaliação primária das amostras. Essa metodologia permite uma padronização da leitura dos esfregaços, bem como a identificação de modificações estruturais das células[17,23].

O método insere-se nos programas de controle de qualidade na avaliação de coleta do esfregaço, disposição do material na lâmina, análise em larga escala e identificação primária de alterações celulares, muitas vezes não visualizadas nos esfregaços convencionais, relativas à sua confecção.

Um dos novos sistemas avançados para a análise primária das amostras é o Focal Point™ Slide Profiler (Figura 4.9, *A*). Essa metodologia permite a avaliação celular pela análise de múltiplos algoritmos, como análise isolada das células, análise de grupos celulares e intensidade de coloração dos núcleos celulares, comparando-a a uma escala que se baseia nas alterações presentes em amostras convencionais, identificando, assim, as anormalidades nas amostras. Permite também a análise de amostras coletadas pelo método convencional[9,18].

O equipamento promove a seleção de 15% da amostra, contendo as alterações celulares a serem analisadas pelo Focal Point™GS Imaging System (Figura 4.9, *B*), metodologia essa que automaticamente identifica as áreas com alterações morfológicas presentes na lâmina e, assim, captura a imagem, transformando em imagens digitalizadas.

Estudos realizados para verificar o desempenho e a eficácia dessa automação em rotinas

laboratoriais coletadas em meio líquido evidenciaram aumento de sensibilidade de 25% no diagnóstico de carcinoma de colo uterino e de 20% nos casos de HSIL. Eles também evidenciaram diminuição de 42% de casos de ASC-US comparados à ocorrência de LSIL[18,19].

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As novas metodologias têm como objetivos principais a melhoria da produtividade e da qualidade do diagnóstico citológico. A padronização de técnicas e a automatização de procedimentos permitem um ganho na qualidade e na sensibilidade do diagnóstico citológico, sem mudar efetivamente as políticas e os programas de prevenção já existentes.

Os processos automatizados permitem a implantação de programas de qualidade interno e externo, padronizados em laboratórios de citologia, valorizando ainda mais a atuação do citologista, que, na maioria das vezes, acredita que a modernização venha para substituir a mão de obra especializada, fato esse que não reflete a realidade.

A figura do citologista torna-se cada vez mais importante nos processos técnicos e diagnósticos, fazendo-o adquirir melhor treinamento, principalmente na identificação de alterações celulares, melhorando assim a sensibilidade do diagnóstico citológico.

A maior dificuldade na implantação de novas metodologias automatizadas se dá pelo fato de os equipamentos exigirem maior demanda econômica dos laboratórios, que muitas vezes não é suprida pela financeira, imposta pelos compradores de serviços.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos ao Departamento de *Marketing* da Becton Dinckson do Brasil, por fornecer e autorizar a divulgação das fotos dos esfregaços cérvico-vaginais e da linha de equipamentos SurePath®. Agradeço, também, ao Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho, coordenador do projeto de Rodeo Trail no Brasil e do Departamento de Pós-graduação do Hospital do Câncer de Barretos, pelas importantes sugestões oferecidas na elaboração deste texto.

Referências

1. ALVES, V. A. B.; CASTELO-FILHO, A.; VIANNA, M. R. et al. Performance of the DNA-Citoloq liquid-based system compared with convencional smears. **Cytopathology**, v. 16, p. 86-93, 2006.
2. BIBBO, M.; WILBURN, D. **Comprehensive Cytopathology**. 3. ed., Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008, p. 53. Cap. 3.
3. BIBBO, M.; WILBURN, D. **Comprehensive Cytopathology**. 3 ed., Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008, p. 61-62. Cap. 4.
4. BIGRAS, G.; REIDER, M.; LAMBERCY, J. et al. Keeping collection device in liquid medium is mandatory to ensure liquid-based cervical cytology sampling. **Journal of Lower Genital Tract Disease**. v. 7, n. 3, p. 168-174, 2003.
5. BUNDRICK, J. B.; COOK, D. A.; GOSTOUT, B. B. Screening for cervical cancer and initial treatment of patients with abnormal results from Papanicolaou testing. **Mayo Clin. Proc. Rochester**. v. 80, n. 8, p. 1063-1068, 2005.
6. COELHO, F. R. G.; SOARES, F. A; FOCCHI, J. et al. **Câncer do Colo do Útero**. 1. ed., São Paulo: Tecmedd, 2008. p. 129-134. Cap. 4.
7. DI LORETO, C.; MAEDA, M. Y. S.; UTAGAWA, M. L. et al. Garantia da qualidade em citopatologia: aspectos da correlação cito-histológica. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43, n. 3, p. 195-198, 1997.
8. FREMONT-SMITH, M.; MARINO, J.; SPENCER, L. et al. Comparasion of the SurePath™ liquid-based Papanicolaou smear with the convencional Papanicolaou smear in a multisite direct-to-vial study. **Cancer Cytopathology**. v. 102, n. 5, p. 269-279, 2004.
9. GRAY, M.; McKEE, G. T. **Diagnostic Cytopathology**. 2. ed., Philadelphia: Churchill Livingstone. 2003, p. 8-10. Cap. 1.
10. GRAY, M.; MCKEE, G. T. **Diagnostic Cytopathology**. 2. ed., Philadelphia: Churchill Livingstone. 2003, p. 644-645. Cap. 28.
11. HELEY, S. Pap test update. **Australian Family Physicians**. v. 36, n. 3, p. 112-115, 2007.
12. JOSTE, N. Overview of the cytology laboratory: specimen processing through diagnosis. **Obstet. Gynecol. Clin. N. Am. Abuquerquer.**, v. 35, p. 549-563, 2008.
13. KOSS, L. G.; MALAMED, M. R. A. **Koss' Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases**. 5. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. v. 1, p. 219-220, 2006. Cap. 8.
14. KOSS, L. G.; GOMPEL, C. **Introduction to Gynecologic Cytopathology with Histologic and Clinical Correlation**. 1. ed., Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 1999, p. 37. Cap. 5.
15. LONGATTO-FILHO, A.; PEREIRA, S. M. M.; DI LORETO, C. et al. DCS liquid-based in more effective than conventional smears to diagnosis of cervical lesion: study in high-risk population whit biopsy-based conformation. **Gynecologic Oncology**, v. 97, p. 497-500, 2004.
16. LONGATTO-FILHO, A.; NAMIYAMA, G.; CASTELO--FILHO, A. et al. Sistema DNA-Citoliq (DCS): um novo sistema para citologia em base líquida – aspectos técnicos.

Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis, v. 17, n. 1, p. 56-61, 2005.
17. MARINO, J.; FERMONT-SMITH, M. Direct-to-vial experience with autocyte prep in a small New England regional cytology practice. **The Journal of Reproductive Medicine**. v. 46, n. 4, p. 353-358, 2001.
18. NANCE, K. V. Evolution of pap testing at a community hospital – a ten year experience. **Diagnostic Cytophatology**. v. 35, n. 3, p. 148-153, 2007.
19. SASS, M. A. Use of a liquid-based, thin-layer pap test in a community hospital. **Acta. Citol. Decatour**, v. 48, n. 1, p. 17-22, 2004.
20. SHIDHAM, V. B.; KUMAR, N.; NARAYAN, R. et al. Should LSIL with ASC-H (LSIL-H) in cervical smears be an independent category? A study on SurePath™ specimens with review of literature. **CytoJournal**, v. 4, n. 7, p. 213-224, 2007.
21. SILFVERDAL, L.; KEMETLI, L.; ANDREA, B. et al. Risk of invasive cervical cancer in relation to management of abnormal pap smear results. **American Journal of Obstetric and Gynecology**. v. 201, p. 11-17, 2009.
22. SWEENEY, B. J.; HAQ, Z.; HAPPEL, J. F. et al. Comparison of the effectiveness of tow liquid-based Papanicolaou system in the handling of adverse limiting factors, such as excessive blood. **Cancer Cythology**. v. 108, n. 1, p. 27-31, 2006.
23. TENCH, W. Preliminary assessment of the AutoCyte Prep direct-to-vial performance. **The Journal of Reproductive Medicine**. v. 45, n. 11, p. 912-916, 2000.
24. YAMAMOTO, L. S. U.; ALVES, V. A. F.; MAEDA, M. Y. S. et al. A morphological protocol and guide-list on uterine cervix cytology associated to Papilomavirus infection. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 46, n. 4, p. 13-19, 2004.
25. YARANDI, F.; MOOD, N. I.; MIRASHRAFI, F. et al. Colposcopic and histologic findings in women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gyneacology**, v. 44, p. 514-516, 2004.
26. ZIELINSKO, G. D.; SNIJDERS, P. J. F.; ROZENDAAL, F. J. et al. HPV presence precedes abnormal cytology in women developing cervical cancer and signal false negative smears. **British Journal of Cancer**, v. 3, n. 85, p. 398-404, 2001.

Capítulo 5

Processos Reacionais/Benignos dos Epitélios Escamoso e Endocervical

Ana Katherine da Silveira Gonçalves
Janaina Cristiana de Oliveira Crispim
Márcia Edilaine Lopes Consolaro

INTRODUÇÃO

Os epitélios escamoso e endocervical estão sujeitos a uma variedade de estímulos que resultam em alterações morfológicas em níveis epitelial e celular. O epitélio escamoso da ectocérvice consiste em uma única camada de células basais e de múltiplas camadas de células parabasais, intermediárias e superficiais. A membrana basal separa o epitélio do estroma subjacente. As células superficiais esfoliam da superfície do epitélio, ao passo que o processo de regeneração e divisão celular está limitado à camada de células basais. O epitélio endocervical é composto de uma camada única de células colunares altas. Dentre as células colunares da endocérvice, dois tipos celulares podem ser identificados: células secretoras e ciliadas (ver detalhes no Capítulo 1).

A regeneração do epitélio endocervical geralmente ocorre a partir de células basais pequenas, triangulares e intercaladas, denominadas células primitivas (e comumente chamadas de células de reserva do epitélio colunar endocervical). Em certas condições de estresse, as células de reserva podem aumentar seu número e desencadear um processo reacional denominado hiperplasia das células de reserva da endocérvice[1,2,3].

Assim, quando os epitélios escamoso e endocervical enfrentam condições de estresse que colocam em risco sua estrutura e funcionamento normal, suas células sofrem mudanças reacionais que permitem a sobrevida e a manutenção do seu funcionamento. As células podem se adaptar, sofrendo mudanças reacionais no tamanho, no número e no tipo. Essas mudanças, ocorrendo isoladamente ou em combinação, podem levar

ao aumento da permeabilidade vascular e da migração de leucócitos e à modificação na estrutura dos epitélios, como acantose, atrofia, hipertrofia, hiperplasia, metaplasia e reparo.

Neste capítulo, serão discutidos os processos reacionais dos epitélios escamosos e endocervical, ressaltando os fenômenos de hiperdiferenciação, metaplasia escamosa, reparo e inflamação, que constituem a citologia reativa benigna. É importante relembrar e ressaltar que:

> *O diagnóstico citológico não é apenas um relatório de malignidade, mas uma interpretação de alterações patológicas de vários tipos de células. Alterações degenerativas, progressivas, neoplásicas e inflamatórias podem ser acompanhadas e interpretadas.*

TIPOS DE REAÇÕES PROLIFERATIVAS BENIGNAS

Após destruição parcial ou completa dos epitélios vaginal, ectocervical ou endocervical por determinado agente agressor, esses epitélios mobilizam mecanismos de proliferação e diferenciação para reverter o dano, denominados reações proliferativas benignas. Existem diversos processos histológicos diante de uma agressão. Dentre eles, podem-se destacar acantose, hiperqueratose e paraqueratose, hiperplasia das células de reserva, hiperplasia basocelular, metaplasia escamosa e reparação. Didaticamente, as reações proliferativas benignas (Quadro 5.1) podem ser divididas em[1]:

- Processos de proteção: hiperdiferenciação e metaplasia escamosa.
- Processos de reparação.
- Processos destrutivos-inflamação.

Quadro 5.1 – Processos proliferativos benignos cérvico-vaginais

Processos proliferativos benignos
- Processos de proteção
  - Hiperdiferenciação
    - Acantose
    - Hiperqueratose
    - Paraqueratose
  - Hiperplasia de células de reserva
    - Metaplasia escamosa imatura
    - Metaplasia escamosa matura
- Processo de reparação
  - Proliferação de células de reserva endocervicais ou basais escamosas
    - Reparo
- Processos destrutivos
  - Inflamação

PROCESSOS DE PROTEÇÃO

Hiperdiferenciação

O mecanismo de proteção utilizado pelo epitélio estratificado escamoso cérvico-vaginal, quando ele está sofrendo a influência de estimulação crônica mais grave, é denominado hiperdiferenciação[1,2]. O processo de hiperdiferenciação é representado por acantose, hiperqueratose e paraqueratose.

Na *acantose*, o epitélio aumenta seu poder de proteção com o aumento da sua espessura, especialmente do estrato espinhoso. É caracterizada histologicamente pelo aumento do número de células e, consequentemente, da espessura do epitélio[2,3].

Hiperqueratose consiste no espessamento do estrato córneo associado com uma anormalidade qualitativa da queratina. Ocorre queratinização da camada superficial do epitélio escamoso, que representa uma diferenciação anormal, uma vez que o epitélio estratificado escamoso da ecto e da encocérvice é, em condições de normalidade, não queratinizado[2,3]. Certas condições, por exemplo, irritação mecânica no descenso ou prolapso uterino, levam à hiperqueratose.

Macroscopicamente é caracterizada como uma área branca e bem-delimitada no colo uterino, que é evidente a olho nu, denominada leucoplasia. A cor branca é decorrente da presença de queratina e é uma observação clínica importante. Em geral, a leucoplasia é idiopática, mas também pode ser causada por irritação crônica decor-

rente de corpos estranhos, infecção pelo HPV ou neoplasia escamosa. Seja qual for a área que a leucoplasia ocupe no colo uterino, ela deve ser submetida a biópsia para descartar neoplasia intraepitelial cervical (NIC) ou neoplasia maligna. Entretanto, nas áreas de leucoplasia, é praticamente impossível avaliar a vascularização subjacente por colposcopia.

Citologicamente, na *hiperqueratose* são observadas escamas anucleadas, que são células escamosas maturas, anucleadas. Na região central, onde se encontravam os núcleos, observa-se uma zona clara denominada "núcleo-fantasma". O citoplasma é orangiófilo (Figuras 5.1 a 5.3).

Paraqueratose é outro tipo de queratinização anormal do epitélio estratificado escamoso não queratinizado ectocervical e vaginal. É caracterizada pela retenção dos núcleos aos estratos córneos (queratinizados). A paraqueratose pode ser dividida em típica ou atípica, conforme aspecto dos núcleos. *Paraqueratose típica* é observada como grupos ou camadas de células com citoplasma orangiófilo e núcleos, em geral, pequenos, condensados e hipercromáticos; nas camadas,

Figura 5.1 – Hiperqueratose ou escamas anucleadas. Célula escamosa matura, anucleada (núcleo-fantasma), com citoplasma orangiófilo. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

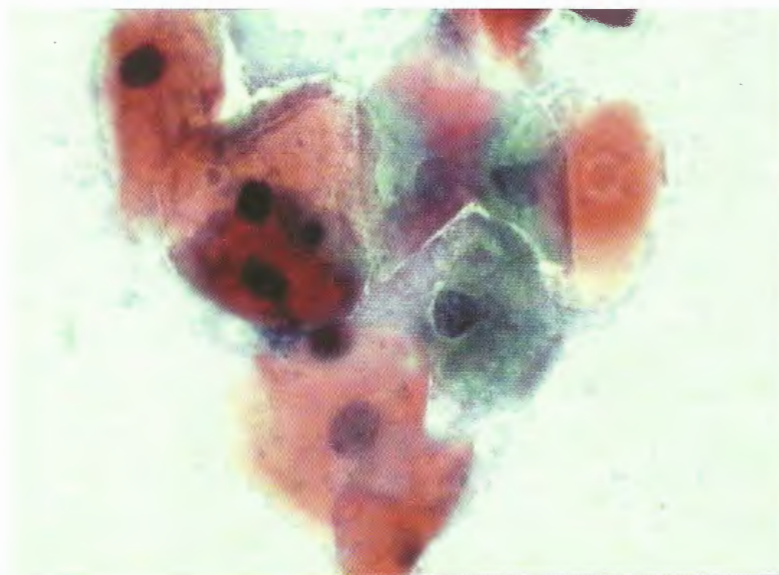
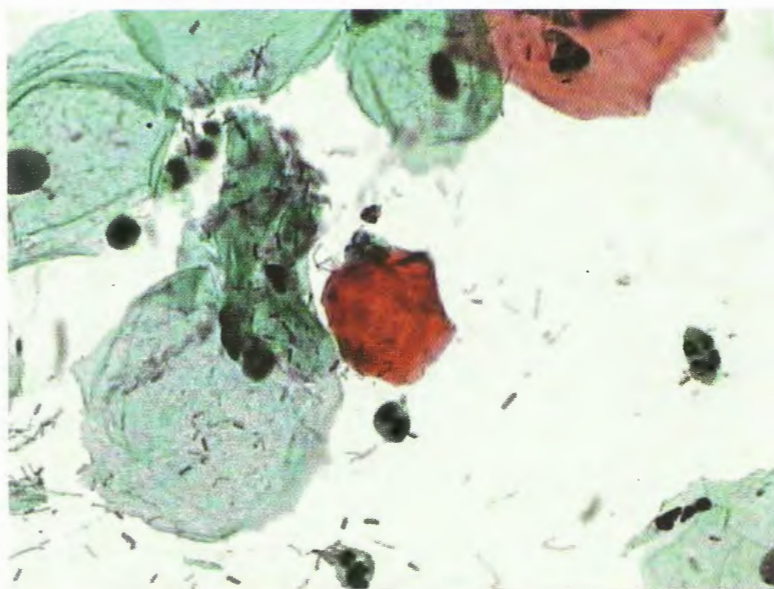



Figura 5.2 – Hiperqueratose ou escamas anucleadas. Célula escamosa matura, anucleada, com citoplasma orangiófilo. Presença de lactobacilos e escassos leucócitos polimorfonucleares. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

os limites celulares podem ser indistintos, dando a aparência sincicial. A *paraqueratose atípica, também denominada disqueratose*, é caracterizada por intensa atividade proliferativa, com aumento do surgimento de mitoses, havendo predisposição ao surgimento de mutações e, dessa forma, multiplicando o risco de transformação com o aparecimento de lesões intraepiteliais. Citologicamente são observados núcleos "atípicos" hipercromáticos, com margens irregulares, cromatina grosseira e irregularmente distribuída, em grupos ou camadas de células com citoplasma orangiófilo (Figuras 5.3 e 5.4).

Metaplasia escamosa

Por definição, metaplasia consiste em fenômeno adaptativo que resulta em um novo tipo celular mais bem preparado para suportar um ambiente adverso. Ocorre a substituição de um epitélio adulto e diferenciado por outro epitélio adulto e também diferenciado, porém mais resistente. Pode ser observada em diferentes partes do organismo humano, como cérvice uterina, esôfago e pulmões. Essa mudança não necessariamente envolve transformação celular verdadeira, mas uma resposta reativa do núcleo ou citoplasma[4].

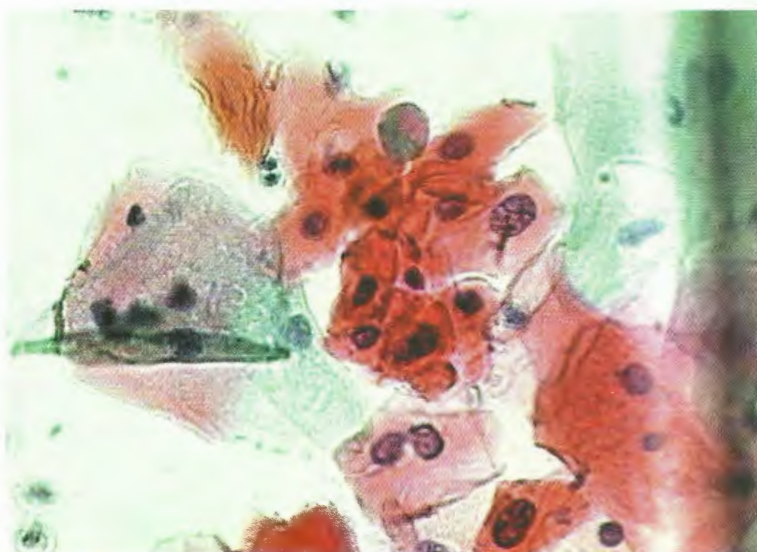



Figura 5.3 – Hiperqueratose e paraqueratose atípica (disqueratose). Presença de hiperqueratose ou escama anucleada, representada por uma célula escamosa matura, anucleada, com citoplasma orangiófilo. Disqueratose representada pela presença de agregado celular orangiófilo com núcleos hipercromáticos, com margens irregulares, cromatina grosseira e irregularmente distribuída. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

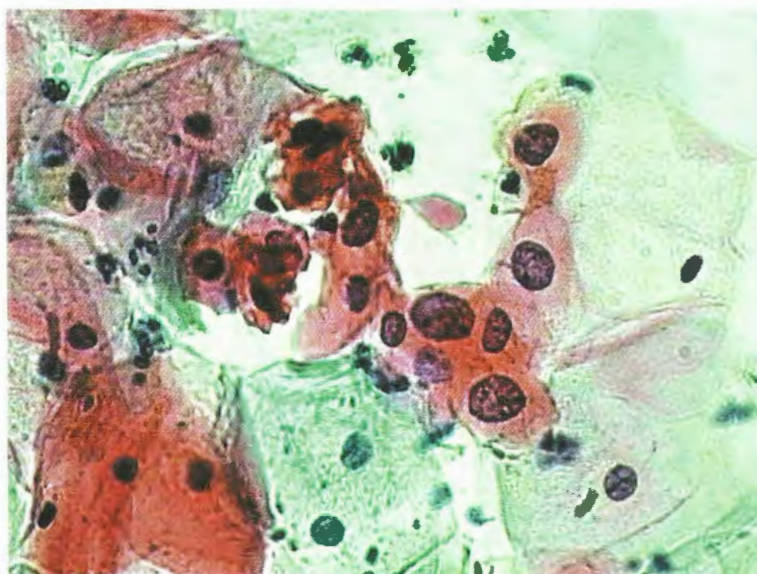



Figura 5.4 – Paraqueratose atípica (disqueratose). Disqueratose representada pela presença de agregado celular orangiófilo com núcleos hipercromáticos, com margens irregulares, cromatina grosseira e irregularmente distribuída. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

A *metaplasia escamosa* é um evento fisiológico na cérvice uterina, sendo caracterizado pela substituição gradual do epitélio colunar evertido por epitélio estratificado escamoso neoformado na zona de transformação cervical. O processo de metaplasia escamosa envolve mecanismos genéticos, resultantes da inativação de alguns genes, e desrepressão de outros, que condicionarão o novo tipo de diferenciação celular. É o mecanismo protetor mais comum do epitélio endocervical, sendo um processo irreversível. O epitélio transformado (agora de natureza escamosa) não é revertido a epitélio colunar. A metaplasia escamosa pode progredir a uma velocidade diferente nas diversas áreas do colo uterino. Assim, são vistas muitas áreas de graus bem diferentes de maturidade no epitélio escamoso metaplásico, com ou sem ilhotas de epitélio colunar. O epitélio metaplásico adjacente à junção escamocolunar é composto de metaplasia imatura, e o epitélio metaplásico maduro é visto próximo da junção escamocolunar original.

Os *fatores promotores da metaplasia* são aqueles ocasionados por mudança do meio ou por ação de diferentes estímulos. Esses estímulos são duradouros, como irritação crônica física ou química, inflamação persistente, mudanças endócrinas, uso de anticoncepcionais, pólipo endocervical e tecido ectópico.

Acredita-se que a acidez vaginal desempenhe função importante na ocorrência de metaplasia escamosa. O ambiente vaginal é ácido durante os anos reprodutivos e a gravidez. Quando as células endocervicais são repetidamente destruídas pela acidez vaginal em uma área de ectrópio, com o tempo elas são substituídas. A contracepção hormonal é associada a aumento da ectopia cervical, menor maturação epitelial cervical e edema tecidual em alguns estudos[5,6], mas não em outros[7].

A *metaplasia escamosa pode ser dividida em:*

- Hiperplasia das células de reserva.
- Metaplasia escamosa imatura.
- Metaplasia escamosa matura.

A transformação direta do epitélio colunar maduro em epitélio escamoso jamais é vista. A *hiperplasia das células de reserva* do epitélio colunar endocervical é a primeira etapa da metaplasia escamosa. Passam a existir uma ou várias camadas de pequenas células imaturas (células de reserva subcilíndricas), localizadas entre a membrana basal e o epitélio colunar endocervical. Células de reserva são raramente observadas na amostragem celular de esfregaço citológico. São células pequenas e têm forma geralmente retangular, com 12 a 14 μm de largura por 8 a 10 μm de altura, que podem variar em colo de recém-nascidas em relação às cérvices de mulheres adultas. O citoplasma é cianofílico e finamente vacuolizado. O núcleo centralmente localizado é pequeno e redondo ou oval ou, ocasionalmente, em forma de rim. A cromatina é finamente granular e pode formar pequenos cromocentros.

Esfregaços preparados mediante raspados diretos da endocérvice ou de ectopia agregam uma maior proporção de células de reservas. Histologicamente, deve haver no mínimo três camadas de células de reserva para se diagnosticar hiperplasia das células de reserva. Essas células, que normalmente se diferenciariam em células colunares endocervicais, diferenciam-se em células escamosas do tipo basal, gerando a hiperplasia de células basais e, assim, o epitélio metaplásico imaturo recém-formado (*metaplasia imatura*), que pode desenvolver-se de duas maneiras. Na grande maioria das mulheres, o epitélio metaplásico imaturo converte-se em epitélio escamoso metaplásico maduro (*metaplasia matura*) pela ação dos hormônios do ciclo menstrual sobre as células basais (ver detalhes no Capítulo 2). Torna-se assim semelhante, para fins práticos, ao epitélio escamoso original normal, que contém glicogênio. Na minoria das mulheres, pode-se desenvolver epitélio atípico displásico, isso porque certos tipos de HPV oncogênicos podem infectar de modo persistente as células metaplásicas escamosas basais imaturas e transformá-las em células atípicas com anomalias nucleares e citoplasmáticas. Assim, a proliferação e a expansão descontrolada dessas células metaplásicas imaturas atípicas podem levar à formação de epitélio displásico anormal, que pode regredir e voltar à condição normal, persistir como

displasia ou evoluir para neoplasia invasiva após vários anos.

A metaplasia escamosa imatura na zona de transformação cervical consiste no epitélio de maior risco para a transformação celular. À medida que o epitélio metaplásico sofre o processo de maturação, diminui o risco de transformação neoplásica. Epitélio metaplásico imaturo ou maduro na cérvice caracteriza o que se denomina mucosa de transformação e corresponde à zona de transformação da colposcopia (ver detalhes no Capítulo 1).

Na citologia, a metaplasia escamosa matura pode ser detectada mediante a presença, no esfregaço cérvico-vaginal, de células isoladas ou agrupadas, com bordas distintas, arredondadas ou poliédricas, com citoplasma mais densamente corado, podendo apresentar projeções citoplasmáticas. O citoplasma às vezes está vacuolizado e/ou com hipercorabilidade periférica. Os núcleos são relativamente pequenos, arredondados e frequentemente centrais, com tamanho uniforme e cromatina granular fina (Figuras 5.5 a 5.7).

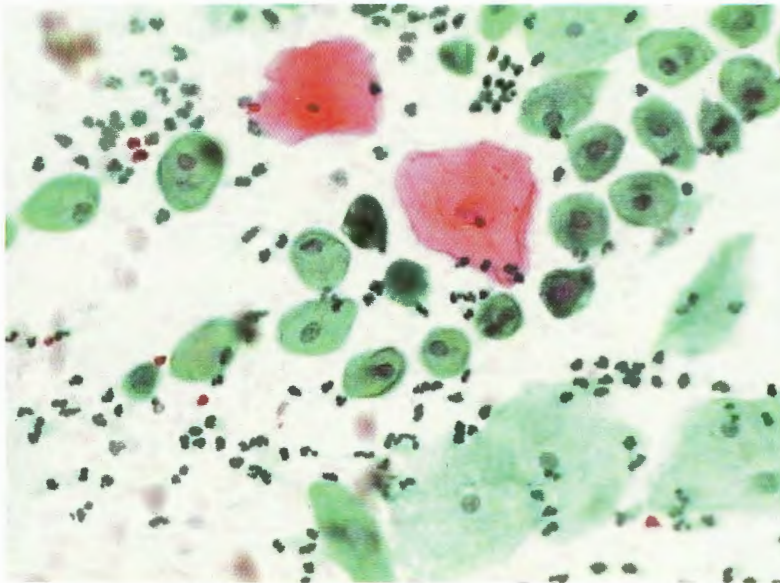



Figura 5.5 – Metaplasia escamosa. Presença de células escamosas metaplásicas características com citoplasma escasso e núcleo de tamanho médio, central, duas células escamosas superficiais e frequentes leucócitos PMN. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (200×).

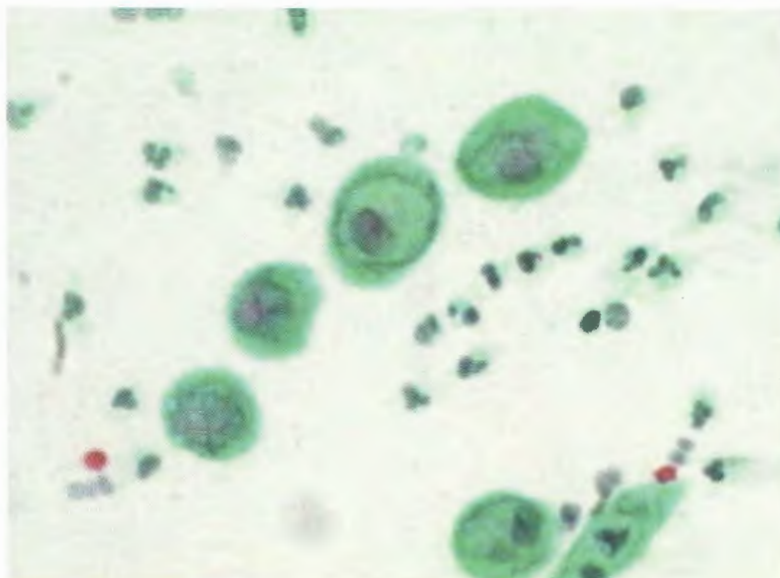
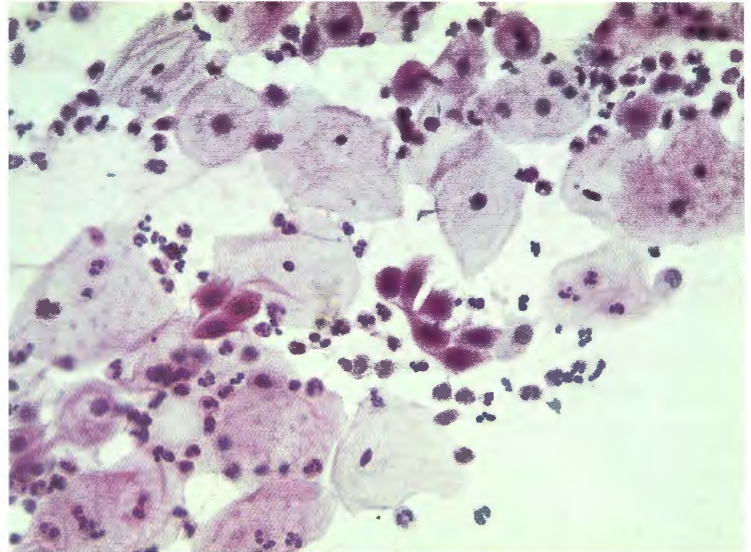



Figura 5.6 – Metaplasia escamosa. Presença de células escamosas metaplásicas características com citoplasma escasso, às vezes vacuolizado e/ou com hipercorabilidade periférica, com núcleo de tamanho médio, central. Leucócitos PMN. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

Figura 5.7 – Metaplasia escamosa. Presença de células escamosas metaplásicas características com citoplasma escasso, às vezes vacuolizado e/ou com hipercorabilidade periférica, com núcleo de tamanho médio, central. Leucócitos PMN. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (200×).

Metaplasia tubária

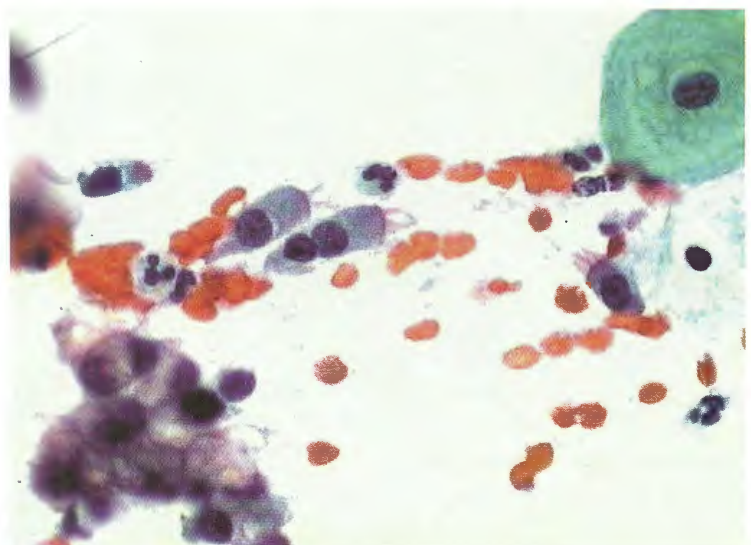
É caracterizada pela presença de epitélio ciliado da tuba uterina em substituição ao epitélio endocervical e, por vezes, ao endometrial. Citologicamente é dificilmente observado. A detecção de grande número de células colunares ciliadas pode sugerir metaplasia tubária (Figura 5.8).

Metaplasia escamosa endometrial (MEE)

MEE é frequentemente associada a situações inflamatórias endometriais crônicas. Compreende um grupo celular com morfologia heterogênea e com capacidade de proliferação e diferenciação observada em endométrio eutrópico e ectópico. A diferenciação da MEE sofre influências do processo de metaplasia morular, que é um fenômeno regido por mutação que contribui para o fenótipo da MEE[4].

Metaplasia papilar imatura atípica (MPA)

Representa uma forma menos comum de metaplasia, sendo uma variante pouco comum da LSIL. Sua presença é frequentemente associada a HPV dos tipos 6 e 11. A histologia parece ser o método diagnóstico que melhor caracteriza a

Figura 5.8 – Células colunares ciliadas. Células colunares ciliadas, que podem representar metaplasia tubária. Hemácias. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

lesão. Histologicamente, MPA apresenta áreas de proliferação celular imatura de aspecto papilífero, com atipia citológica variável e tendência a estender-se ao canal endocervical. Difere do condiloma típico, por não apresentar coilocitose nem outros sinais histológicos de infecção viral[8].

PROCESSOS DE REPARAÇÃO

A destruição focal dos epitélios cervicais desencadeia uma reação de reparação. Os processos de reparação podem ocorrer tanto na mucosa glandular como na escamosa da cérvice uterina. As alterações citológicas podem aparecer em células dos epitélios cilíndrico, escamoso ou metaplásico[2]. As causas dos danos incluem biópsias, cauterização, criocirurgia, histerectomia, radioterapia, entre outras.

A reparação do epitélio escamoso tem início com a proliferação basocelular na periferia da área lesada, processo esse que pode progredir até recobrir toda a superfície comprometida. As células epiteliais jovens são caracterizadas por apresentarem núcleos relativamente grandes e hipercromáticos. A atividade mitótica pode ser intensa. A maioria das mitoses é normal, ainda que seja possível observar algumas mitoses atípicas. Pode-se observar, ainda, queratinização anômala.

No epitélio da endocérvice, a reparação ocorre por meio da proliferação das células de reserva. Nesse epitélio, a reação de reparação costuma caracterizar-se por células com grandes núcleos e nucléolos proeminentes, podendo haver infiltração do epitélio endocervical por leucócitos polimorfonucleares.

Citologicamente é muito difícil diferenciar a origem do reparo, se escamosa ou endocervical. De maneira geral, são observados grupamentos celulares que apresentam citoplasma denso, tipo "fumaça", anisonucleose, além de núcleos com cromatina granular, irregularmente distribuída, com nucléolos evidentes com contorno nuclear regular, denominado comumente como *reparo típico* (Figura 5.9). Quando as alterações nucleares são muito intensas e o contorno nuclear, irregular, o *reparo é chamado de atípico*. Principalmente nesse caso, o diagnóstico diferencial entre reparação e HSIL, ou ocasionalmente adenocarcinomas, pode ser muito difícil.

PROCESSOS DESTRUTIVOS – INFLAMAÇÃO

O trato genital feminino possui vários mecanismos de defesa contra agentes infecciosos, que atuam de forma sinérgica e complementar. Os

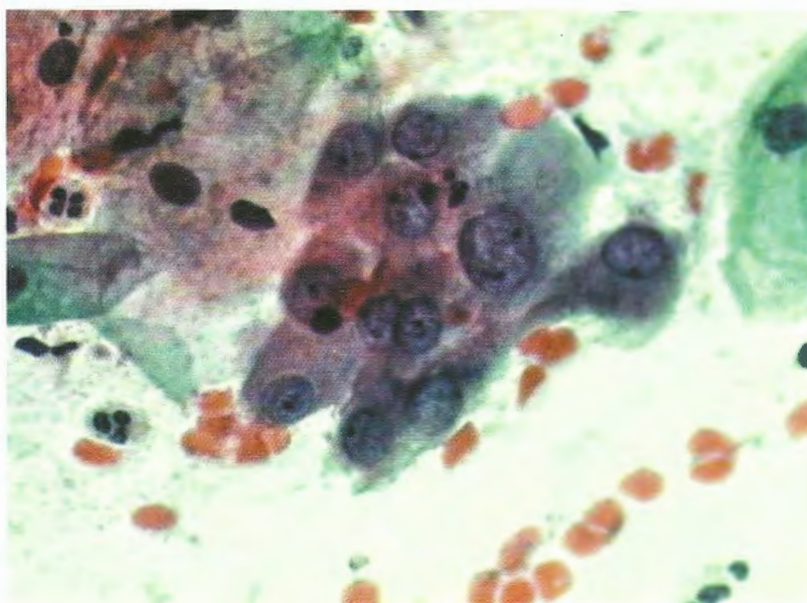



Figura 5.9 – Reparo típico. Grupamento celular apresentando citoplasma denso, tipo "fumaça", anisonucleose, além de núcleos com cromatina granular, irregularmente distribuída, com nucléolos evidentes e contorno nuclear regular. Hemácias. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

mecanismos iniciais de defesa compreendem: barreira epitelial, síntese de muco protetor, pH vulvar e vaginal, microbiota vaginal e componentes inespecíficos inerentes à imunidade inata (células fagocitárias e reação inflamatória)[9] (ver detalhes no Capítulo 8).

Em mulheres no menácme, o epitélio estratificado escamoso vaginal é constituído de várias camadas de células escamosas, distribuídas em quatro tipos celulares: basais, parabasais, intermediárias e superficiais. Estas constituem uma barreira física responsável pela manutenção da integridade do epitélio, exercendo papel de proteção contra a ação de agentes patogênicos[9,10]. Constituem um verdadeiro tapete apto a sofrer distensão, retração e adaptação a diversas circunstâncias, inclusive agressão a microrganismos[10,11,12]. Na fase do climatério, por conta do declínio na produção de hormônios, a mulher volta a ter pH e microbiota vaginal semelhantes ao da infância, sendo observado achatamento das camadas celulares da mucosa vaginal com dificuldades para manutenção dos pH e microbiota ideal[13].

O ecossistema vaginal é dinâmico, podendo sofrer alterações de quantidade e composição na dependência de fatores intrínsecos e extrínsecos da mulher. Essas diferenças determinam respostas de adequação aos diversos agentes agressores e também diferentes manifestações clínicas[9,10,11,12,13].

No ecossistema vaginal, existem lactobacilos produtores de ácido láctico, peróxido de hidrogênio, entre uma série de outros compostos que têm efeito protetor contra patógenos estranhos ao meio vaginal, limitando o crescimento de microrganismos potencialmente nocivos ao equilíbrio do ecossistema vaginal. O ácido láctico produzido pelos lactobacilos mantém o pH vaginal ácido, protegendo também o meio vaginal de microrganismos patogênicos.

Os epitélios cérvico-vaginais sofrem constantemente diferentes graus de agressão por diferentes agentes: infecciosos, mecânicos, químicos e físicos. Esses fatores proporcionam a perda do equilíbrio homeostático e o surgimento de processos inflamatórios[15,16]. Esses agentes podem atuar de maneira local ou sistêmica, modificando o ecossistema vaginal, ou, ainda, de forma localizada, lesando as células epiteliais da mucosa cérvico-vaginal[11,14].

Inflamação cérvico-vaginal

Inflamação

Por definição, inflamação é a resposta dos tecidos às lesões ocasionadas por vários agentes, como bactérias, vírus, fungos, parasitos, trauma, reações químicas, calor, frio ou radiação. No processo inflamatório, ocorrem, em sequências cronológicas, lesões celulares e teciduais, distúrbios circulatórios, exsudato e fenômenos proliferativos e reparadores. A inflamação é caracterizada pelo conjunto de todas essas alterações ou fenômenos. Ocorre como uma resposta inespecífica, caracterizada por uma série de alterações que tendem a limitar os efeitos da agressão, sendo uma das principais reações defensivas do organismo[17].

Didaticamente, há uma divisão simples e útil nos tipos de inflamações em aguda, subaguda, crônica e granulomatosa, como a seguir:

- *Processo inflamatório agudo ou de evolução rápida*: dura poucos dias e gera necrose com destruição dos tecidos (pus), com presença de leucócitos polimorfonucleares (PMN).
- *Processo inflamatório subagudo*: dura mais tempo em relação ao agudo, o processo de destruição e reparo é de menor intensidade, com a presença de PMN e histiócitos.
- *Processo inflamatório crônico ou de evolução lenta*: a duração pode levar meses, sendo caracterizado pela persistência do agente lesivo, fazendo que a cicatriz não se complete. Há presença de histiócitos.
- *Processo inflamatório granulomatoso*: de evolução lenta, caracteriza-se por células diferenciadas denominadas células epitelioides. Consiste em reação vaginal rara, associada a agentes específicos como *Mycobacterium tuberculosis*.

Principais causas de inflamação cérvico-vaginal[1,3]

Inflamação cérvico-vaginal por agentes físicos

Decorrente de lesões de partos, após cirurgias via vaginal, lesões traumáticas e por perfurocortantes, crioterapia, laserterapia, eletrocautério, dispositivo intrauterino (DIU), radiações e corpos estranhos.

Inflamação cérvico-vaginal por agentes químicos

Dermatite de contato por vestuário, anticoncepcionais intravaginais e espermicidas. Antissépticos como permanganato de potássio, mercúrio, cromo, iodo, cremes, xampus, desodorantes vaginais. Lubrificantes (vaselina), talco de luva e preservativo. Líquido seminal e saliva. Cremes à base de sulfa. Reações a drogas.

Inflamação cérvico-vaginal por agentes vivos

Fungos, bactérias, vírus e protozoários.

A inflamação cérvico-vaginal, na presença de um agente causal detectado no esfregaço citológico, é dita específica; quando ele não é detectado, inespecífica.

As vulvovaginites e as cervicites constituem os principais processos inflamatórios que acometem as mucosas cérvico-vaginais. Nas vulvovaginites, o processo infeccioso limita-se ao epitélio escamoso estratificado da ectocérvice e da vagina, sendo as mais frequentes candidíase e tricomoníase. Nas cervicites ou endocervicites, o processo infeccioso ocorre no epitélio grandular da endocérvice, tendo como principais agentes etiológicos *Chlamydia trachomatis e Neisseria gonorrhoeae*[18,19,20].

Classificação dos processos inflamatórios cérvico-vaginais conforme sua localização topográfica[1]

- *Vulvovaginites ou cervicocolpites*: acometem o epitélio estratificado escamoso da ectocérvice e da vagina. Elas podem ser:
  - *Erosivas*: com descamação epitelial, podendo ser divididas em atrófica ou senil e inflamatórias.
    - *Atrófica ou senil*: tanto em crianças como em mulheres após a menopausa, o epitélio escamoso é, em geral, atrófico, condição essa que facilita a instalação de processos inflamatórios. A menopausa, ou ausência dos ciclos menstruais regulares, é uma consequência do decréscimo na produção de hormônios esteroides. Epitélios escamosos e endocervicais exageradamente atróficos são barreiras muito precárias contra as infecções. Tais epitélios apresentam-se adelgaçados, o que predispõe à aquisição de fissuras e escoriações, que podem servir para a entrada de diferentes patógenos. Na colposcopia, por causa do afinamento do epitélio, são observados vasos mais expostos, visíveis por transparência. Por sua fragilidade, mostram, com frequência, sufusões hemorrágicas ou petéquias. A junção escamocolunar (JEC) está localizada, em geral, na endocérvice. Diante de um quadro atrófico avançado, observa-se comumente inflamação no esfregaço cérvico-vaginal, denominada vaginite senil ou atrófica. A cervicocolpite atrófica senil é erosiva e não infecciosa, própria dos epitélios atróficos verificados na pós-menopausa e na senilidade. As células escamosas parabasais estão acompanhadas de características morfológicas inflamatórias. O fundo do esfregaço mostra um material característico, amorfo, basófilo, resultado da degeneração das células parabasais (Figuras 5.10 a 5.14).
    - *Inflamatórias*: denomina-se simplesmente inflamação os processos inflamatórios que acometem o epitélio escamoso trófico, característico da fase reprodutiva adulta da mulher (ver detalhes no Capítulo 2). Os processos inflamatórios atingem o epitélio escamoso, provocando descamação mais ou menos ampla, com o surgimento de erosões. Na histologia, esse epitélio mostra-se adelgaçado, com diminuição no número de camadas, conteúdo de glicogênio reduzido e distribuído de forma irregular no epitélio.

Figura 5.10 – Colpite senil. Células escamosas parabasais inflamatórias apresentando vacuolização citoplasmática e cariopicnose. Frequentes leucócitos PMN. Fundo do esfregaço característico, amorfo, basófilo. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

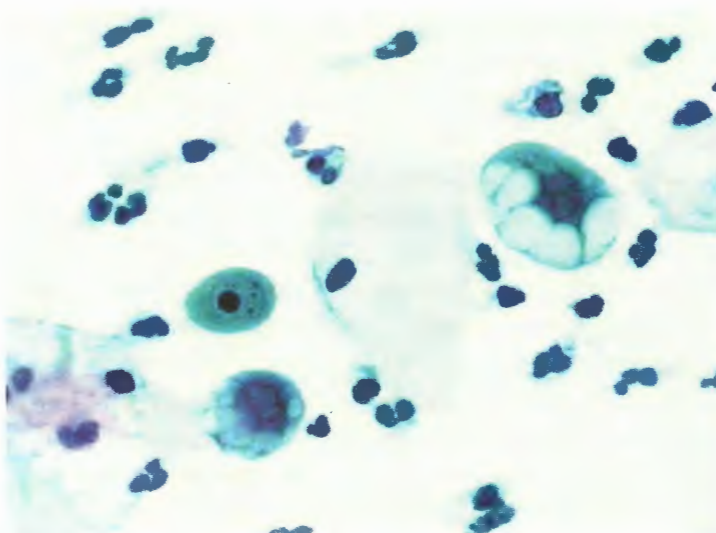



Figura 5.11 – Colpite senil. Frequentes células escamosas parabasais inflamatórias apresentando cariomegalia, pseudoeosinofilia, cariopicnose e autólise. Frequentes leucócitos PMN. Fundo do esfregaço característico, amorfo, basófilo. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

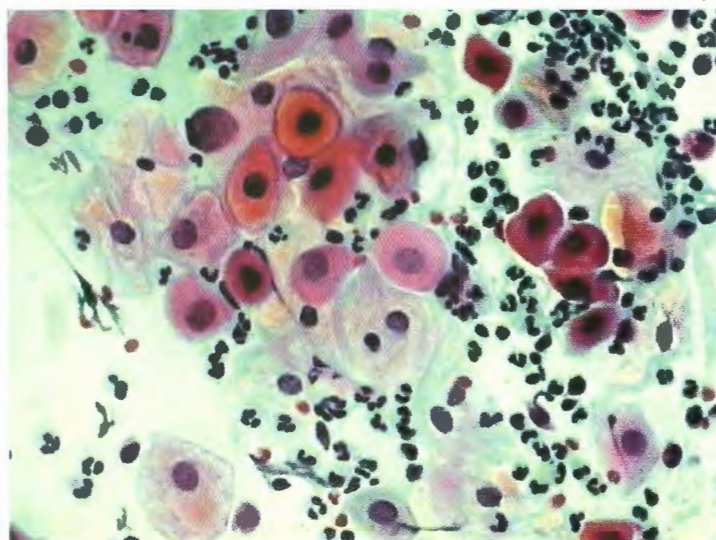
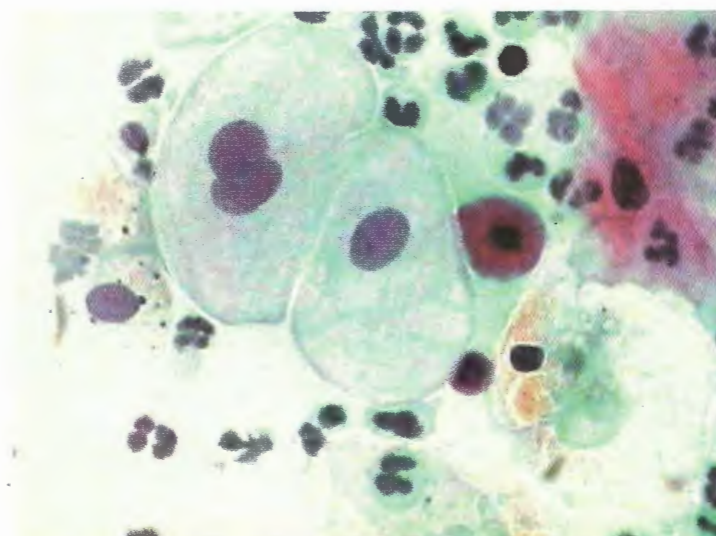



Figura 5.12 – Colpite senil. Células escamosas inflamatórias apresentando binucleação, cariomegalia, pseudoeosinofilia, cariopicnose e escassa autólise. Leucócitos PMN e histiócitos. Fundo do esfregaço característico, amorfo, basófilo. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

O tecido conjuntivo de sustentação mostra-se congesto, com vasos dilatados. No esfregaço cérvico-vaginal, são observadas características morfológicas inflamatórias nas células escamosas superficiais, intermediárias e parabasasais, quando da descamação delas.

- *Ulcerativas*: nesse processo, o epitélio escamoso descama-se totalmente, com o surgimento de um exsudato inflamatório (fibrinoleucocitário). Com a progressão da inflamação, há o surgimento de necrose e perda de tecido conjuntivo, culminando com ulceração. Essas cervicocolpites estão frequentemente associadas à infecção por herpes-vírus. O diagnóstico diferencial deve ser feito com as ulcerações neoplásicas, traumáticas e, sobretudo, com duas lesões específicas: as ulcerações de natureza sifilítica e tuberculosa.
- *Papilomatosas*: podem ser difusas ou localizadas, com hiperplasia epitelial. Nas cervicocolpites papilomatosas difusas, o epitélio escamoso mostra-se espessado, com boa maturação e repleto de projeções. Na superfície das papilas, o epitélio é fino, com células achatadas, a maioria disceratótica, com núcleo denso e irregular.

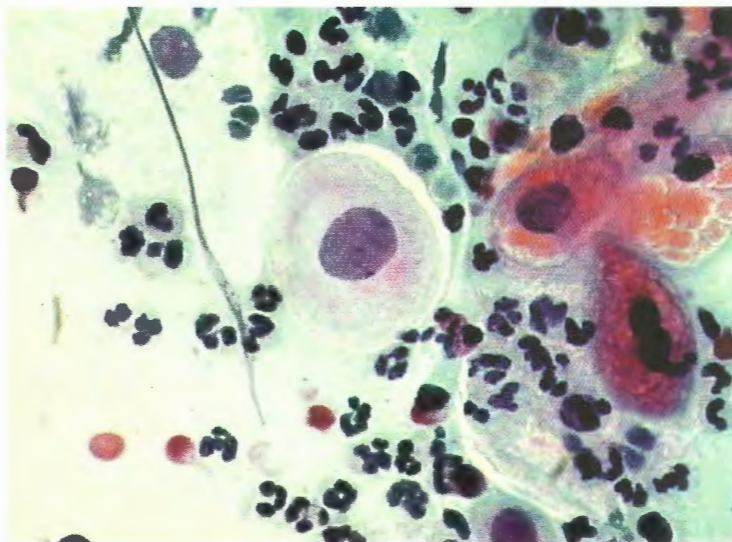



Figura 5.13 – Colpite senil. Células escamosas parabasais inflamatórias apresentando cariomegalia, pseudoeosinofilia, anfofilia, cariopicnose, binucleação e autólise. Leucócitos PMN e histiócitos, raras hemácias. Fundo do esfregaço característico, amorfo, basófilo. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

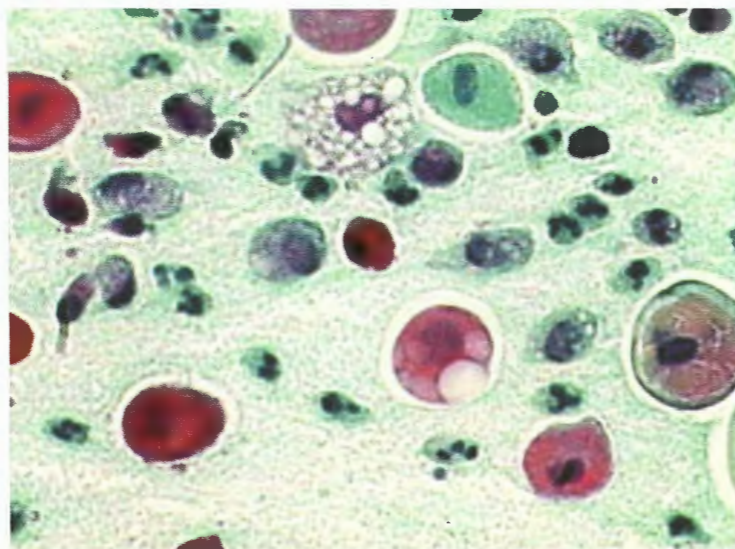



Figura 5.14 – Colpite senil. Células escamosas parabasais inflamatórias apresentando pseudoeosinofilia, cariopicnose e vacuolização citoplasmática. Leucócitos polimorfonucleares e histiócitos. Fundo do esfregaço amorfo e basófilo. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

As cervicocolpites papilomatosas localizadas são representadas pelas lesões clássicas e típicas do condiloma acuminado. O processo hiperplásico é localizado e geralmente multifocal. As lesões são volumosas e podem ser vistas a olho nu. O epitélio é muito espesso, porém apresenta maturação irregular. As células são vacuolizadas, com halos perinucleares muito grandes e com marginalização periférica e núcleos densos, irregulares e desiguais (coilocitose e anisocariose). Podem-se localizar, com frequência , células bi ou multinucleadas (Figuras 5.15 e 5.16) (ver detalhes nos Capítulos 7 e 11).

- *Cervicites ou endocervicites*: acometem o epitélio glandular da endocérvice.
  Ocorre geralmente hipersecreção glandular (mucorreia), com muco cervical turvo ou purulento. Pode-se visualizar grande número de papilas edemaciadas e de diferentes tamanhos. Erosão ou ulceração está comumente associada, recoberta por exsudato fibrinoleucocitário. No córion, ocorre infiltrado de leucócitos PMN, linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Na colposcopia, após a remoção do exsudato, observa-se que o muco presente no orifício externo é geralmente

Figura 5.15 – Cervicocolpites papilomatosas. Os coilócitos são células vacuolizadas, com halos perinucleares muito grandes e com marginalização periférica, e núcleos densos, irregulares e desiguais. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

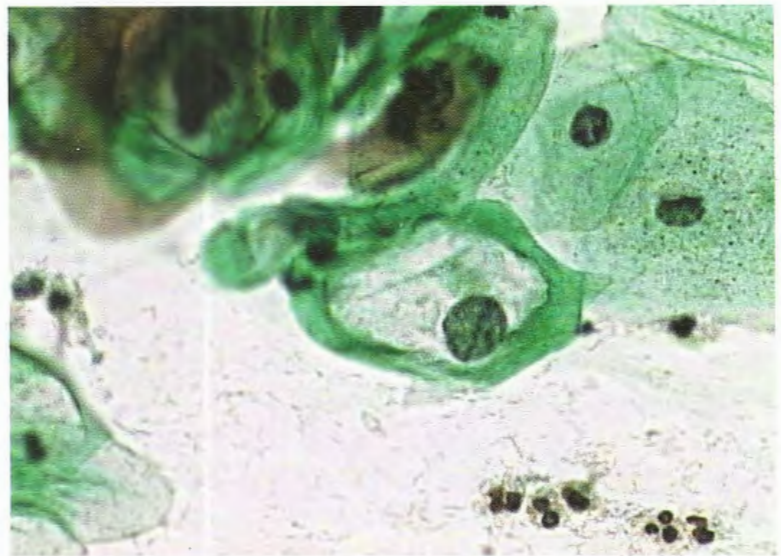
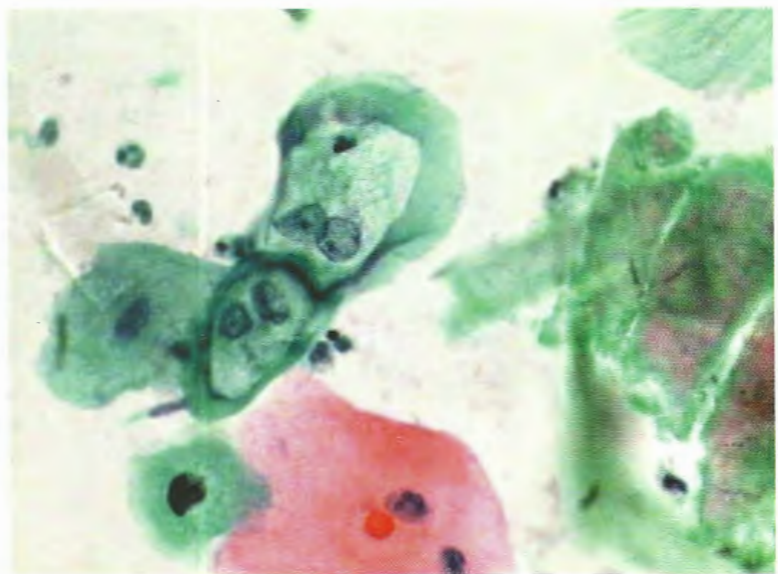



Figura 5.16 – Cervicocolpites papilomatosas. Os coilócitos são células vacuolizadas, com halos perinucleares muito grandes e com marginalização periférica. Binucleação, núcleos densos, irregulares e desiguais. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

turvo e purulento. Com a aplicação do ácido acético a 2%, a mucosa glandular mostra-se avermelhada e com sangramento fácil.

A reepitelização ocorre mediante hiperplasia das células de reserva, que repõe o epitélio colunar simples (quando na endocérvice) ou escamoso (metaplasia escamosa, quando na ectocérvice).

CITOLOGIA DAS LESÕES INFLAMATÓRIAS CÉRVICO-VAGINAIS

A citologia tem papel importante no reconhecimento das lesões inflamatórias do sistema genital feminino: permite avaliar a intensidade da reação inflamatória, acompanhar sua evolução e, em certos casos, determinar a natureza do agente causal.

Para a avaliação correta dos esfregaços citológicos nos processos inflamatórios, é importante definir o grau de atividade biológica, a qualidade e a adequabilidade da amostra, caracterizar o tipo de secreção localizada durante a coleta, determinar se existem patógenos no esfregaço e observar o aspecto do seu fundo. Na presença de reação inflamatória, é detectado, nos esfregaços, exsudato inflamatório composto de leucócitos, principalmente PMN e histiócitos, e detritos, que constituem evidência de necrose celular (esfregaços "sujos") (Figuras 5.17 a 5.19). Os neutrófilos (PMN) (Figura 5.20) são as primeiras células a chegarem ao foco inflamatório, representando melhor os processos inflamatórios agudos. Já os linfócitos representam melhor os processos inflamatórios crônicos. Ainda, as células plasmáticas e os histiócitos caracterizam melhor os processos inflamatórios crônicos, por exemplo, na cervicite crônica grave[21]. Isoladamente, os leucócitos, principalmente do tipo PMN, não necessariamente indicam uma reação inflamatória. Em alguns estágios do ciclo menstrual, como na fase lútea, sua presença em maior quantidade é fisiológica (ver detalhes no Capítulo 2).

Histiócitos aparecem nas formas grandes ou pequenas, com citoplasma cianofílico, espumoso (microbolhas ou vacúolos), sem margens celulares nítidas e são característicos das reações inflamatórias crônicas. Histiócitos pequenos são regularmente observados na fase menstrual tardia, mas em outra fase do ciclo menstrual podem indicar inflamação. O núcleo está excentricamente localizado e exibe uma grande variação na forma, podendo ser redondo, oval ou em forma de feijão, e apresenta cromatina fina, uniformemente granular e vários cromocentros. Os histiócitos grandes são capazes de realizar fagocitose e, por isso, contêm bactérias, leucócitos, hemácias e outros fragmentos celulares (ver detalhes no Capítulo 5).

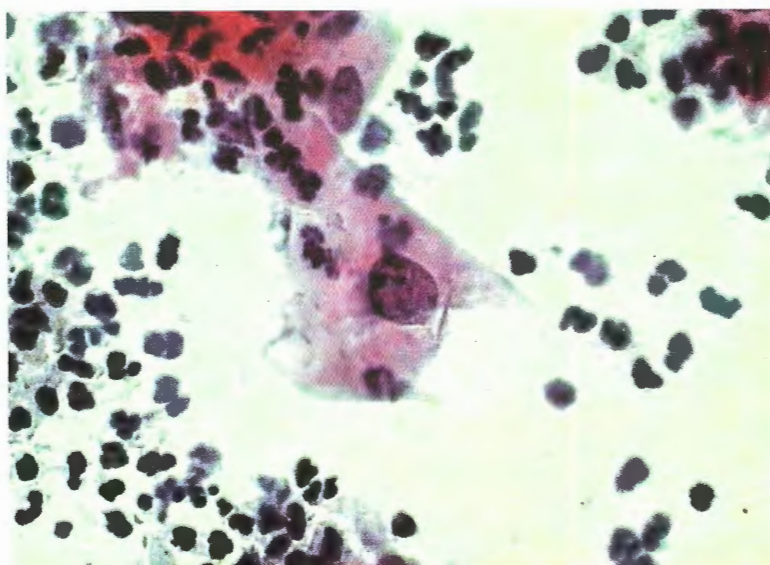



Figura 5.17 – Fundo de esfregaço "sujo" inflamatório. Célula escamosa intermediária apresentando pseudoeosinofilia, discreto halo perinuclear, apagamento de bordas citoplasmáticas e cariomegalia. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

Figura 5.18 – Fundo de esfregaço "sujo" inflamatório. Célula escamosa apresentando grande halo perinuclear e apagamento de bordas citoplasmáticas. Fundo de esfregaço com lactobacilos. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

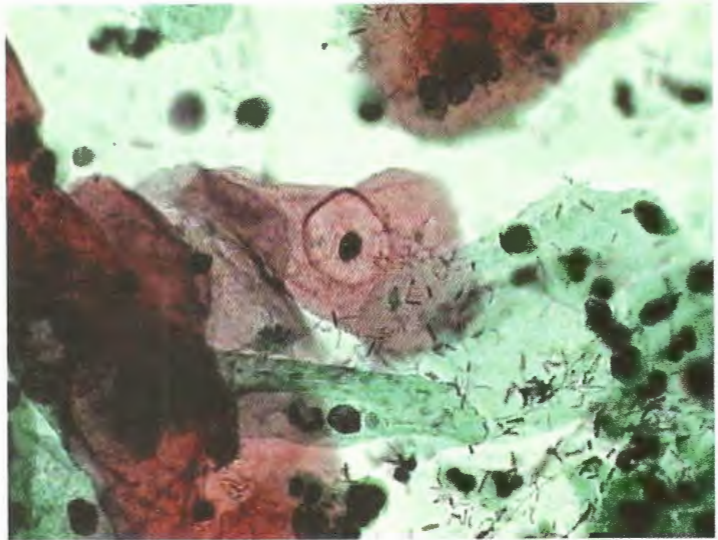



Figura 5.19 – Fundo de esfregaço "sujo" inflamatório. Fundo de esfregaço "sujo", que constitue evidência de necrose celular, leucócitos degenerados e bactérias em quadro inflamatório acentuado do epitélio escamoso vaginal. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

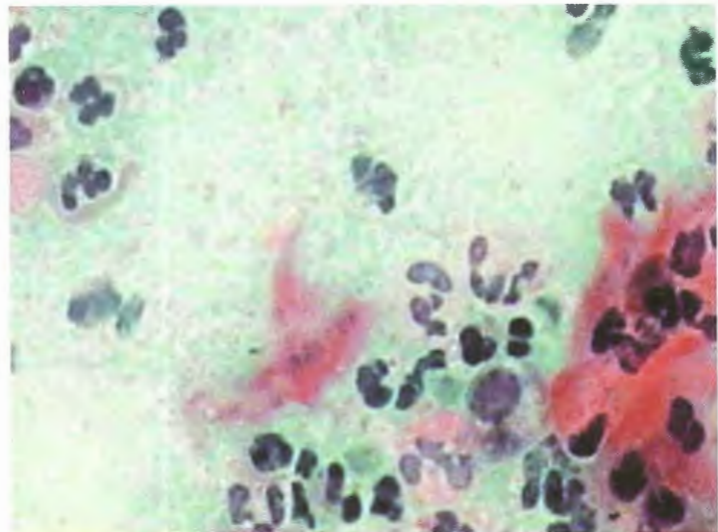
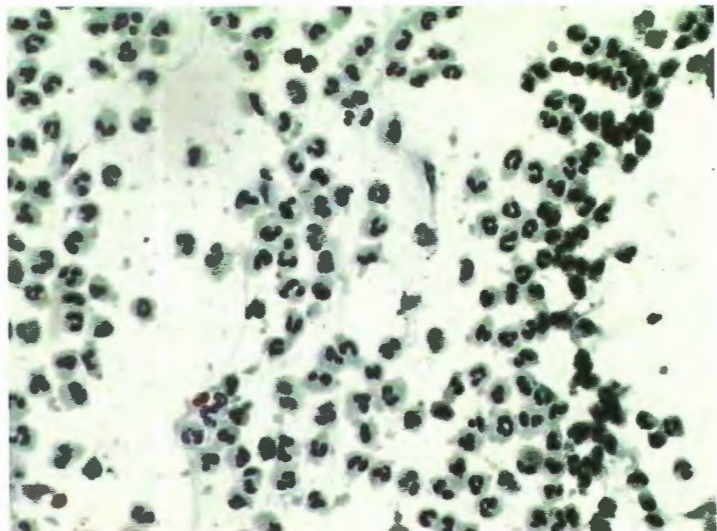



Figura 5.20 – Fundo de esfregaço "sujo". Frequentes leucócitos do tipo PMN e poucos histiócitos pequenos e mononucleares. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (200×).

Na vigência de um processo inflamatório, a análise dos tipos celulares presentes em um esfregaço cérvico-vaginal pode ser difícil. Pode ocorrer uma mudança no tipo celular predominante não relacionada com o estado hormonal da mulher. No esfregaço de mulheres jovens com ulceração do epitélio escamoso, podem ser observadas células parabasais. Já no de mulheres menopausadas, a falsa eosinofilia citoplasmática pode mimetizar um esfregaço com predomínio de células superficiais[21].

Alterações inflamatórias nas células epiteliais

As alterações celulares inflamatórias podem afetar o núcleo, assim como o citoplasma, e podem finalmente levar à morte celular. Na citólise, a destruição do citoplasma é causada por enzimas bacterianas, normalmente associada à presença de *Lactobacillus* spp., não estando relacionada com processo inflamatório. No processo de autólise, a destruição citoplamática acontece por fenômenos não exógenos, como a atrofia. O dano celular irreversível é, em geral, acompanhado de acúmulo de líquidos, ocasionando os aumentos nuclear e celular, e cromatólise. Lesões mecânicas ou infecções virais podem destruir estruturas da superfície celular. Alterações nucleares idênticas podem ser causadas por diferentes mecanismos isolados ou numerosos.

Os sinais mais precoces de degeneração nuclear são a condensação e o espessamento da borda da cromatínica, localizada abaixo da membrana nuclear, que culminará com a fragmentação do núcleo em pequenos grânulos, denominada cariorrexe. Essas características nucleares, quando observadas em cultura de células, são decorrentes da apoptose. Existem, porém, poucas informações sobre essa relação nas células epiteliais no organismo humano. Apoptose é a morte celular programada, ao passo que a necrose representa a morte celular acidental. Células que sofrem necrose podem apresentar vacuolização citoplasmática extensiva, núcleos cariopicnóticos ou cariomegalia[2].

As alterações nucleares inflamatórias mais comuns nas células escamosas são:

- Aumento nuclear ou cariomegalia.
- Bi ou multinucleação. Pode estar presente em infecção viral (herpes), inflamação ou após radioterapia. É o resultado de divisão nuclear sem a simultânea divisão celular.
- Aumento de nucléolos. Evento comum na inflamação e no reparo tecidual. Todas as células podem conter nucléolos aumentados.
- Marginalização da cromatina, que é a cromatina disposta junto à margem nuclear.
- Cariólise, que é a homogenização da cromatina com lise subsequente no núcleo, seguida de cariorrexe, que é a fragmentação do núcleo em grânulos escuros.
- Cariopicnose, que é a condensação da estrutura nuclear, seguida de cariorrexe.

Em nível de citoplasma, vacuolização é a característica típica de inflamação, além de halos perinucleares. Esses halos são regulares e normalmente pequenos, devendo ser diferenciados dos presentes na coilocitose ("escavação").

Ainda como decorrência do processo inflamatório, podem ocorrer variações de coloração do citoplasma das células escamosas em relação às células normais, provavelmente em decorrência de mudanças na carga iônica da membrana citoplasmática. Pode-se observar falsa eosinofilia, que, em todo o citoplasma celular, é denominada pseudoeosinofilia, ou apenas em partes do citoplasma, chamada de anfofilia ou metacromasia[21]. É importante salientar que essas características devem ser consideradas apenas em células escamosas intermediárias, parabasais e metaplásicas, cujo citoplasma normalmente é apenas cianofílico.

As Figuras 5.10 a 5.14 e 5.17 a 5.24 mostram as principais características de fundo de esfregaço e celulares (nucleares e citoplasmáticas) decorrentes de inflamação nas células escamosas observadas em esfregaços cérvico-vaginais.

Nas células colunares endocervicais, reações inflamatórias não específicas podem também induzir a alterações consideráveis. Podem ocorrer tumefação e vacuolização citoplasmática,

978-85-4120-024-0

Figura 5.21 – Processo inflamatório. Célula escamosa intermediária apresentando pseudoeosinofilia, halo perinuclear, apagamento de bordas citoplasmáticas e cariomegalia. Leucócitos PMN. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

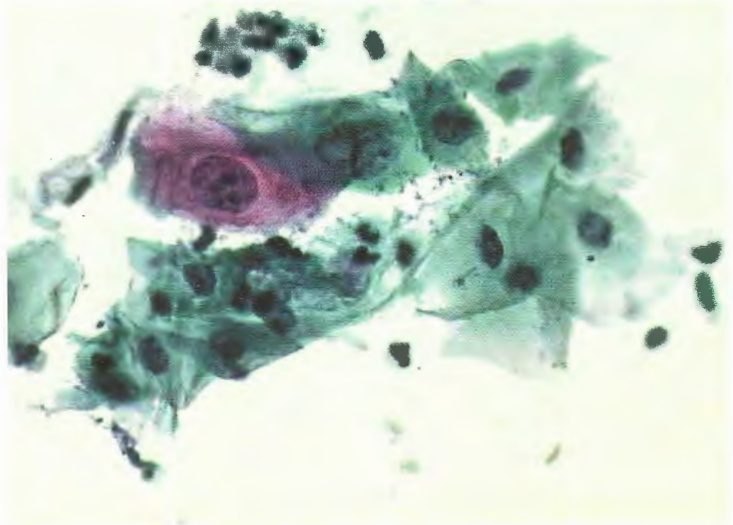



Figura 5.22 – Processo inflamatório. Célula escamosa intermediária apresentando cariomegalia, apagamento de bordas citoplasmáticas e lise parcial. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

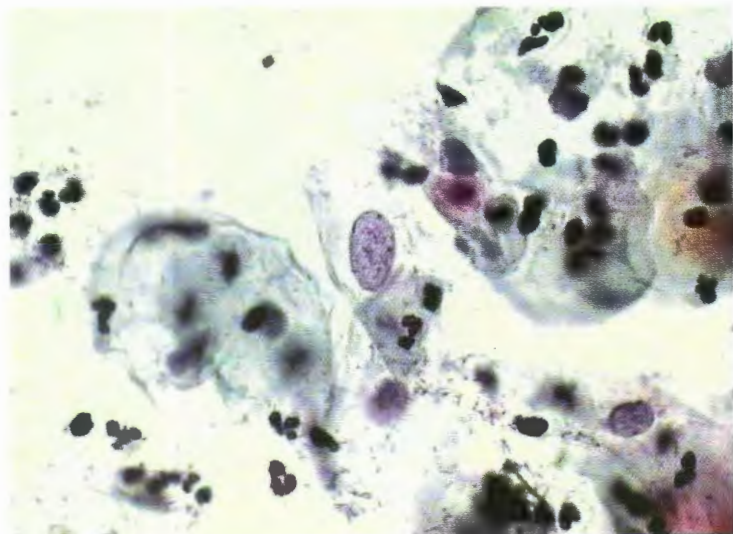



Figura 5.23 – Processo inflamatório. Célula escamosa intermediária apresentando halo perinuclear, apagamento de bordas citoplasmáticas e metacromasia. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

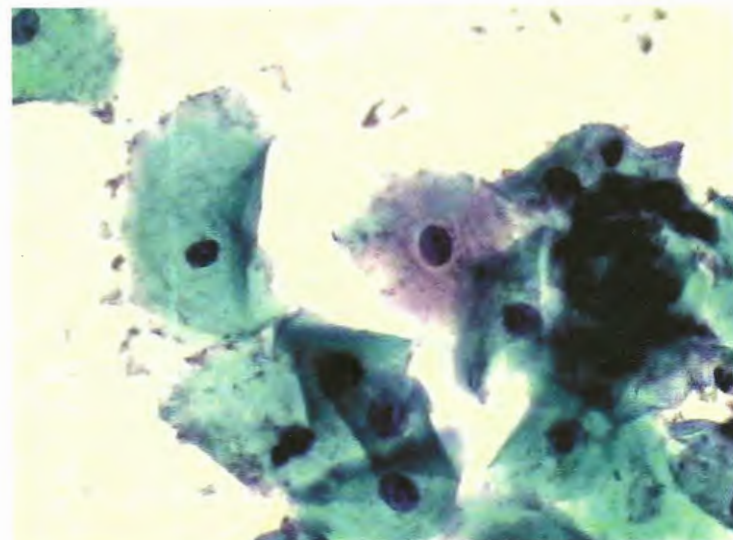
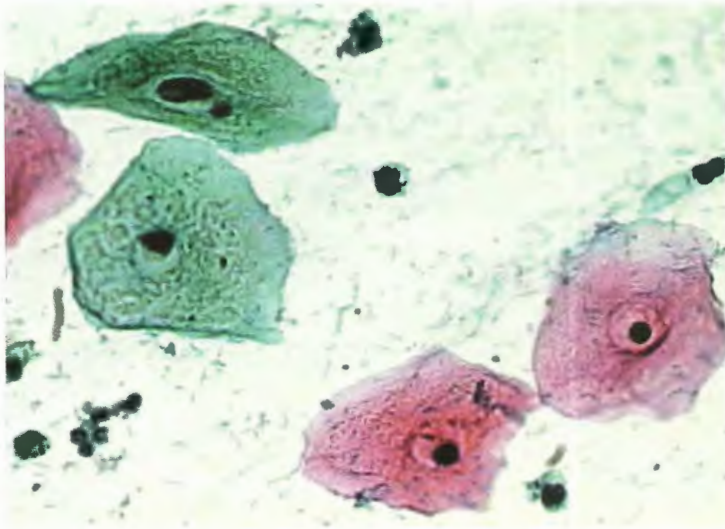



Figura 5.24 – Processo inflamatório. Células escamosas intermediárias e superficiais apresentando halo perinuclear. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

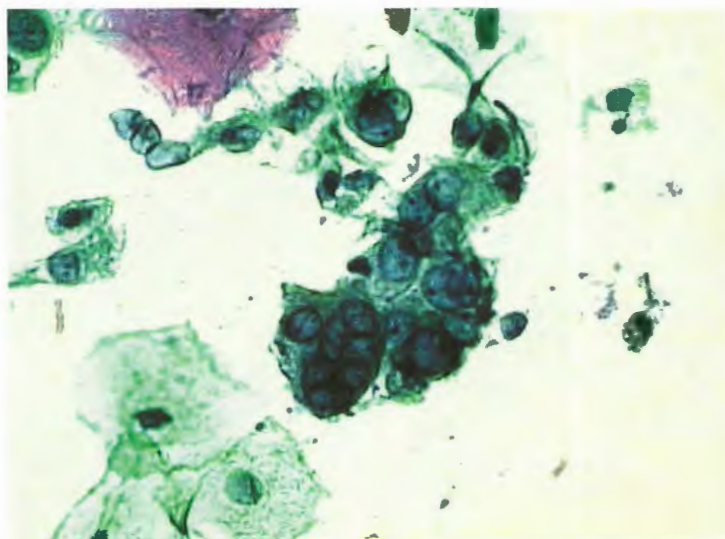



Figura 5.25 – Endocervicite. Células colunares endocervicais apresentando cariomegalia, multinucleação, cromatina finamente granular e marginalizada e nucléolos discretamente aumentados. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

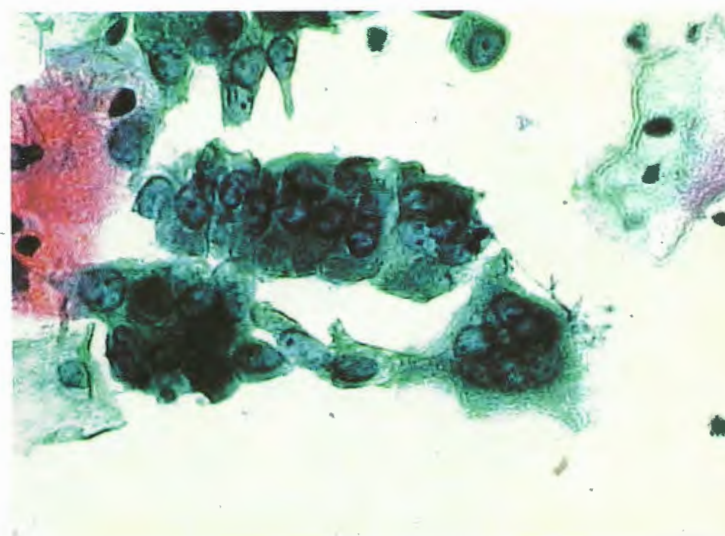



Figura 5.26 – Endocervicite. Células colunares endocervicais em "favo de mel" e em "paliçada" apresentando cariomegalia, multinucleação, cromatina finamente granular e marginalizada, nucléolos discretamente aumentados e escassa sobreposição. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

978-85-4120-024-0

além de infiltração por PMN. Uma vez que o citoplasma é menos resistente na endocervicite, ele frequentemente desintegra-se em lençóis com núcleos grandes e brandos. Existe aumento celular, do número de cromocentros e aparecem micro e macronucléolos. Bi e multinucleação são comuns. A relação núcleo/citoplasma e a disposição da cromatina, porém, estão pouco alteradas (Figuras 5.25 e 5.26)[21].

OUTROS TIPOS DE REAÇÕES PROLIFERATIVAS BENIGNAS

Uso de DIU

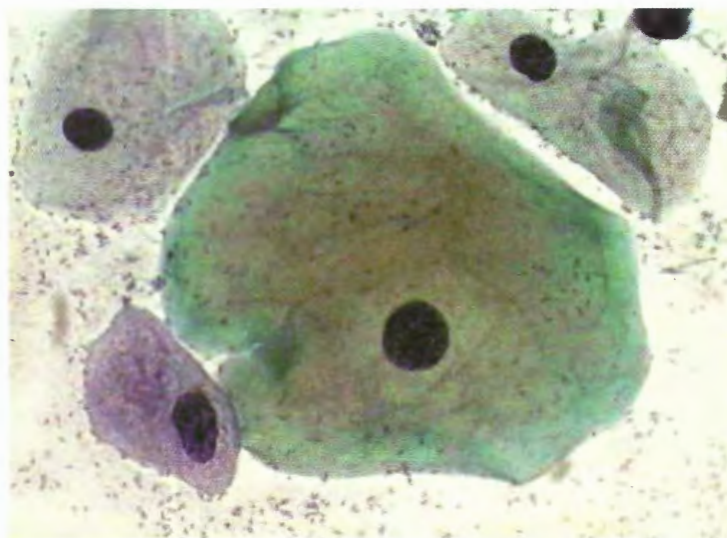
O efeito dos DIU é refletido, principalmente, no epitélio colunar. Em geral, essas células estão dispostas em pequenos grupos de 5 a 15 células. Os nucléolos podem ser proeminentes e a quantidade de citoplasma, variável. Com frequência, grandes vacúolos deslocam o núcleo, criando uma imagem de anel de sinete, que pode mimetizar imagens de carcinoma endometrial[3].

Radiação

As alterações celulares decorrentes da radiação podem ser observadas nos epitélios escamoso e glandular. Células imaturas ou pouco diferenciadas são mais suscetíveis à lesão radioativa. Pequenas doses de radiação podem, intermitentemente, interferir na produção de RNA mensageiro e, por isso, diminuir a síntese de proteínas. Doses maiores inibem a síntese de DNA e podem causar danos irreparáveis nele, além da inibição da atividade mitótica. Os achados citológicos verificados nesses processos são observados no núcleo e no citoplasma de forma equivalente. Em geral, um aumento marcante de toda célula é a regra, com o possível aparecimento de formas bizarras, por exemplo, células em forma de girino ou outras formas não usuais. Os núcleos apresentam-se aumentados e com forma irregular e mostram sinais de degeneração. No entanto, a relação núcleo/citoplasma não está significantemente aumentada, uma vez que o núcleo e o citoplasma aumentam em escalas iguais (Figura 5.27)[3]. Ainda existem alterações radioativas tardias. Em algumas situações, as alterações radioativas ainda estão presentes por até 20 anos após a radioterapia.

Ação dos agentes alquilantes

Os agentes alquilantes utilizados na quimioterapia são drogas que podem induzir a alterações do epitélio escamoso, similares àquelas que surgem nas lesões precursoras do carcinoma cervical. As alterações celulares são aumento celular e presença de vacúolos citoplasmáticos, os núcleos variam de forma e tamanho e podem apresentar cromatina grosseira granular e hipercromática.

Figura 5.27 – Alterações celulares decorrentes da radiação. Célula central apresentando aumento de tamanho marcante, com núcleo também aumentado, hipercromático e cromatina granular. A relação núcleo-citoplasma está normal. As demais células apresentam as mesmas características nucleares anormais. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

Referências

1. SILVA FILHO, A. M.; LONGATTO FILHO, A. **Colo Uterino e Vagina:** processos inflamatórios – aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
2. BIBBO, M.; WILBUR, D. C. **Comprehensive Cytopathology**. 3. ed., Philadelphia: Saunders, 2008.
3. KOSS, G. K.; MELAND, M. R. **Koss Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases**. 5. ed., v. 1. New York: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
4. NICOLAE, A.; PREDA, O.; NOGALES, F. F. Endometrial metaplasias and reactive changes: a spectrum of altered differentiation. **J. Clin. Pathol.**, v. 64, n. 2, p. 97-106, 2011.
5. CRITCHLOW, C. W.; WÖLNER-HANSSEN, P.; ESCHENBACH, D. A. et al. Determinants of cervical ectopia and of cervicitis: age, oral contraception, specific cervical infection, smoking, and douching. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 173, n. 2, p. 534-543, 1995.
6. MAUCK, C. K.; CALLAHAN, M. M.; BAKER, J. et al. The effect of one injection of Depo-Provera on the human vaginal epithelium and cervical ectopy. **Contraception**, v. 60, n. 1, p. 15-24, 1999.
7. JACOBSON, D. L.; PERALTA, L.; FARMER, M. et al. Cervical ectopy and the transformation zone measured by computerized planimetry in adolescents. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, v. 66, n. 1, p. 7-17, 1999.
8. TRIVIJITSILP, P.; MOSHER, R.; SHEETS, E. E. et al. Papillary immature metaplasia (immature condyloma) of the cervix: a clinicopathologic analysis and comparison with papillary squamous carcinoma. **Hum. Pathol.**, v. 29, n. 6, p. 641-648, 1998.
9. LAMONT, R.; SOBEL, J.; AKINS, R. et al. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. **BJOG**, v. 118, n. 5, p. 533-549, 2011.
10. BRANDTZAEG, P.; FARSTAD, I. N.; HARALDSEN, G. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. **Immunol. Today**, v. 20, n. 6, p. 267-277, 1999.
11. DAHN, A.; SAUNDERS, S.; HAMMOND, J. A. et al. Effect of bacterial vaginosis, Lactobacillus and Premarin estrogen replacement therapy on vaginal gene expression changes. **Microbes Infect.**, v. 10, n. 6, p. 620-627, 2008.
12. YAN, D. H.; LÜ, Z.; SU, J. R. Comparison of main lactobacillus species between healthy women and women with bacterial vaginosis. **Chin. Med. J. (Engl.)**, v. 122, n. 22, p. 2748-2751, 2009.
13. CAUCI, S.; DRIUSSI, S.; DE SANTO, D. et al. Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 6, p. 2147-2152, 2002.
14. VERSTRAELEN, H.; VERHELST, R.; VANEECHOUTTE M. et al. The epidemiology of bacterial vaginosis in relation to sexual behaviour. **BMC Infect. Dis.**, v. 30, p. 10-81, 2010.
15. BRANCO, K. M.; NARDI, R. M.; MOREIRA, J. L. et al. Identification and in vitro production of lactobacillus antagonists from women with or without bacterial vaginosis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 43, n. 4, p. 338-344, 2010.
16. MIRMONSEF, P.; GILBERT, D.; ZARIFFARD, M. R. et al. The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 65, n. 3, p. 190-195, 2011.
17. CUMMINS JR, J. E.; DONCEL, G. F. Biomarkers of cervicovaginal inflammation for the assessment of microbicide safety. **Sex Transm. Dis.**, v. 36 (Suppl. 3), p. S84-S91, 2009.
18. HOBBS, M. M.; VAN DER POL, B.; TOTTEN, P. From the NIH: proceedings of a workshop on the importance of self--obtained vaginal specimens for detection of sexually transmitted infections. **Sex Transm. Dis.**, v. 35, n. 1, p. 8-13, 2008.
19. FICHOROVA, R. N. Impact of T. vaginalis infection on innate immune responses and reproductive outcome. **J. Reprod. Immunol.**, v. 83, n. 1-2, p. 185-189, 2009.
20. AMSEL, R.; TOTTEN, P. A.; SPIEGEL, C. A. et al. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. **Am. J. Med.**, v. 74, n. 1, p. 14-22, 1983.
21. KOSS, L. G.; GOMPEL, C. **Introdução à Citopatologia Ginecológica com Correlações Histológicas e Clínicas**. São Paulo: Roca, 2006.

Capítulo 6

Microbiologia Cérvico-Vaginal

Márcia Edilaine Lopes Consolaro
Vera Lúcia Dias Siqueira

HISTÓRICO DA UTILIZAÇÃO DA CITOLOGIA CÉRVICO-VAGINAL NA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS E PERSPECTIVAS ATUAIS

A citologia cérvico-vaginal tem papel importante no reconhecimento das alterações inflamatórias e infecciosas do trato genital feminino, designadas pelo Sistema Bethesda para Diagnóstico Citológico/2001 como alterações celulares reativas[1]. Ela permite avaliar a intensidade da reação inflamatória, acompanhar sua evolução e, em certos casos, determinar o agente causal[2].

Para a determinação específica do agente causal de pacientes com doenças infecciosas, são utilizadas técnicas de isolamento e identificação microbiológica. Embora a grande maioria dos microrganismos não possa, porém, ser conclusivamente classificada nas preparações citológicas, sua visualização em esfregaços citológicos e/ou das alterações morfológicas decorrentes destes, como no caso de alguns vírus, com frequência acrescenta informações importantes, que, em algumas circunstâncias, são cruciais para o estabelecimento do diagnóstico clínico e o direcionamento do tratamento[3]. Em decorrência disso, cresce o interesse na utilização da citologia para a detecção preliminar de microrganismos da microbiota vaginal e de algumas infecções cérvico-vaginais associadas ou não a patógenos de transmissão sexual[4].

No Brasil e em boa parte do mundo, um grande número de mulheres é estimulado, por meio de campanhas governamentais, a realizar periodicamente seu exame de citologia oncótica cérvico-

-vaginal com o objetivo principal de rastreio para o câncer cervical. Assim, um grande número de mulheres sexualmente ativas submete-se a esse exame anualmente. A possibilidade de usar esse mesmo exame para a observação da composição da microbiota vaginal e para a detecção preliminar de algumas infecções cérvico-vaginais pode ser muito importante, especialmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, nos quais recursos financeiros não estão disponíveis para a adoção de outras alternativas de diagnóstico. Além disso, também é possível conhecer dados epidemiológicos das populações em relação a diferentes quadros infecciosos, que são importantes para orientar medidas de saúde pública para controle, principalmente, das doenças sexualmente transmissíveis (DST)[4,5]. Nesse contexto, um número crescente de médicos no Brasil tem se baseado nos resultados da citologia para interpretações diagnósticas quanto ao microambiente vaginal, principalmente diante das dificuldades com a abordagem sindrômica para as DST, preconizada pelo Ministério da Saúde. Esse fato deve despertar uma preocupação quanto ao desempenho do método para esse fim nos diferentes laboratórios citológicos.

Em programas de rastreio para o câncer cervical de alguns países, como é o caso do Programa Brasileiro "Viva Mulher", é preconizada a coleta apenas das regiões endo e ectocervical para a citologia oncótica, diferentemente da coleta padrão preconizada internacionalmente (endocervical, ectocervical e vaginal). Por conta da ausência de material da região vaginal, a detecção de microrganismos vaginais é muito prejudicada e várias infecções podem não ser detectadas. Essa conduta nacional deve, portanto, ser cuidadosamente rediscutida.

NOÇÕES DE MICROBIOTA CÉRVICO-VAGINAL

O conteúdo cérvico-vaginal normal é constituído de células epiteliais escamosas, células colunares endocervicais em pequeno número, células endometriais no período menstrual, detritos celulares, muco cervical, microbiota bacteriana variada, leucócitos em pequeno número, água e ácido láctico. Um grande número de microrganismos – a grande maioria espécies bacterianas – é conhecido por colonizar e formar comunidades complexas, ou microbiota, em vários locais dentro do corpo humano e sobre ele. Evidências crescentes sugerem que a composição e a função da microbiota em diferentes *habitats* do corpo desempenham um papel vital no desenvolvimento, na fisiologia, na imunidade e na nutrição do ser humano[6].

Como um dos *habitats* importantes, a vagina abriga espécies diferentes de bactérias em grande número e que são conhecidas por ter efeitos importantes na saúde[7]. Muitas dessas bactérias, como espécies de *Lactobacillus*, não são colonizadores passivos ou transitórios, mas sim parecem estar adaptadas às especificidades do ambiente vaginal[8]. Essas espécies residentes constituem um grupo de seres que têm requisitos semelhantes e desempenham também um papel semelhante dentro de uma comunidade. A manutenção de um número elevado desses microrganismos é uma indicação de condições saudáveis. As mudanças dramáticas nos tipos e nas proporções relativas das espécies microbianas na vagina podem levar a um estado de doença[6].

A vagina e o colo formam um ecossistema complexo com numerosas espécies bacterianas, que podem ser, em circunstâncias particulares, a causa de cervicovaginites acompanhadas de corrimento. Muitas são saprófitas, cuja simples presença no esfregaço não indica processo infeccioso. Para que existam cervicovaginites, deve ser encontrada uma série de alterações gerais e citológicas no corte histológico e/ou no esfregaço citológico[6].

As microbiotas vaginal e cervical são diferentes, mas se superpõem no conteúdo vaginal. As glândulas de Bartholin e Skene, a cavidade uterina, as tubas uterinas, os ovários e as estruturas anexas são estéreis em condições de normalidade. Essa condição é garantida pelas barreiras mecânicas, imunoglobulinas circulantes e fagócitos locais. Os órgãos genitais externos apresentam microbiota da própria pele (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Corynebacterium* spp.

etc.), mais alguns componentes da microbiota intestinal[9,10].

O trato genital inferior apresenta comunicação com o ambiente externo, o que propicia o desenvolvimento de reações inflamatórias infecciosas e não infecciosas. Na vigência desses processos inflamatórios, existem muitas mulheres assintomáticas. Quando sintomáticas, os principais sintomas apresentados são leucorreia, irritação vulvovaginal, coceira, dor, ulceração e sangramento. Embora a maioria desses processos permaneça localizada, existe a possibilidade de ascensão de microrganismos para o trato genital superior, ou seja, cavidade uterina, tubas uterinas e ovários, além de disseminação para a cavidade peritoneal[10].

Em mulheres saudáveis e em idade reprodutiva, o ecossistema vaginal é polimicrobiano, composto de grande número e variedade de microrganismos aeróbios, anaeróbios obrigatórios e facultativos. Os microrganismos vaginais mais frequentemente isolados em cultura são lactobacilos (bacilos de Döderlein), *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus epidermidis*. *Bacteroides* spp. e *Gardnerella vaginalis* podem fazer parte da microbiota vaginal em cerca de 40 a 70% das mulheres normais[11,12]. *Candida* spp. pode ser isolada do conteúdo vaginal em torno de 25% das mulheres assintomáticas. Outros microrganismos também isolados são bacilos difteroides (*Corynebacterium* spp.), *Escherichia coli*, *Fusobacterium* spp. e *Clostridium* spp. Atualmente, trabalhos empregando técnicas não cultiváveis para caracterização de microrganismos mostram a presença de outras espécies bacterianas, como *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* spp., *Eggerthella* spp., entre outras[11]. Deve-se considerar que a microbiota vaginal é dinâmica e, sob certas condições, pode tornar-se patogênica e causar doenças. O Quadro 6.1 lista os microrganismos mais comumente isolados de culturas vaginais de mulheres saudáveis em idade reprodutiva.

Vários fatores podem influenciar a composição da microbiota vaginal. Dentre eles, fatores hormonais fisiológicos ou não, como[10]:

- Gestação: a elevada secreção dos hormônios estrógeno, principalmente progesterona, ocasiona intensa descamação de células escamosas, predominantemente do tipo intermediárias, ricas em glicogênio, proporcionando ambiente muito favorável ao desenvolvimento de microrganismos, principalmente lactobacilos. O pH vaginal torna-se normalmente muito ácido, favorecendo o crescimento de fungos leveduriformes e a ocorrência de candidíase vulvovaginal.
- Parto: ocorre depressão hormonal seguida de atrofia da mucosa escamosa, alcalinizando o pH vaginal e diminuindo sua população lactobacilar. O líquido amniótico é alcalino e também contribui para a elevação do pH vaginal.
- Menstruação: uma depressão hormonal leva à descamação endometrial, diminuindo a acidez vaginal, mas sem contribuir significativamente com mudanças na microbiota. O fluxo menstrual retira o tampão mucoso que protege contra infecções ascendentes.
- Menarca e menopausa: a baixa secreção de hormônios sexuais femininos culmina com a presença de epitélio escamoso vaginal atrófico ou hipotrófico, os quais são finos e deixam o pH alcalino, diminuindo a população lactobacilar e, às vezes, também de outros microrganismos.
- Uso de contraceptivos hormonais.
- Desequilíbrios hormonais.

Quadro 6.1 – Microrganismos mais comumente isolados em cultura do ecossistema vaginal de mulheres saudáveis em idade reprodutiva

• *Lactobacillus* spp.	• *Corynebacterium* spp.
• *Streptococcus* spp.	• *Fusobacterium* spp.
• *Staphylococcus epidermidis*	• *Clostridium* spp.
• *Bacteroides* spp.	• *Escherichia coli*
• *Gardnerella vaginalis*	• *Candida* spp.

Existem fatores como drogas ou doenças que também influenciam a microbiota vaginal. As desordens hepáticas, como a cirrose, mimetizam situações de hiperestrogenismo. Já as metabólicas, como o diabetes melito, podem favorecer a colonização e a infecção por *Candida* spp. Os digitálicos possuem estrutura semelhante ao estrógeno e, portanto, simulam a ação desse hormônio.

Tabela 6.1 – Fatores que podem influenciar a composição da microbiota vaginal

Hormonais	Drogas ou doenças	Fatores locais vaginais
Gestação	*Desordens hepáticas*	DIU
Parto	*Desordens metabólicas*	Contraceptivos vaginais
Menarca	*Drogas simulando hormônios*	Óvulos, pomadas, cremes, antissépticos vaginais
Menopausa	*Antibióticos*	Duchas vaginais
Menstruação		Traumatismos
Desequilíbrios hormonais		Abortos
Contraceptivos hormonais		Exposição sexual
		Infecções
		Erosões e ulcerações

Outros fatores também podem influenciar na composição da microbiota vaginal, como erosões (p. ex., por *Trichomonas*) ou ulcerações, infecções, antibióticos ou, ainda, fatores locais, como uso de DIU, contraceptivos vaginais, traumatismos, abortos, exposição sexual (alcalinidade decorrente do sêmen)[9], apresentados na Tabela 6.1.

DETECÇÃO CITOLÓGICA DA MICROBIOTA VAGINAL

Lactobacilos e vaginose citolítica

Embora trabalhos recentes empregando tecnologias que se baseiam em biologia molecular demonstrem a presença de microrganismos como *Corynebacterium* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* spp., *Bifidobacterium* spp., entre outros, no canal vaginal de mulheres saudáveis, os lactobacilos continuam a ser considerados os principais componentes da microbiota vaginal[12]. Diversas espécies de *Lactobacillus*, também conhecidos como bacilos de Döderlein, são identificadas na vagina humana, incluindo *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. cellobiotus*, *L. oris*, *L. reuteri*, *L. ruminis*, *L. crispatus*, *L. iners*, *L. vaginalis* e *L. crispatus*, sendo *L. acidophilus* a espécie mais conhecida. São bacilos gram-positivos aeróbios ou anaeróbios facultativos que causam citólise das células escamosas intermediárias, ricas em glicogênio citoplasmático (Figura 6.1). Esses microrganismos convertem o glicogênio em glicose e, posteriormente, em ácido láctico, responsável pela acidificação do pH vaginal (3,8 a 4,5), que é adequado por proteger contra a invasão de um grande rol de microrganismos patogênicos. As leveduras são exceção, pois proliferam muito bem em pH ácido[13].

As células parabasais e superficiais possuem baixos níveis de glicogênio e, por isso, são resistentes à citólise pelos lactobacilos. Essas bactérias produzem ainda peróxido de hidrogênio, que é tóxico para certas bactérias como

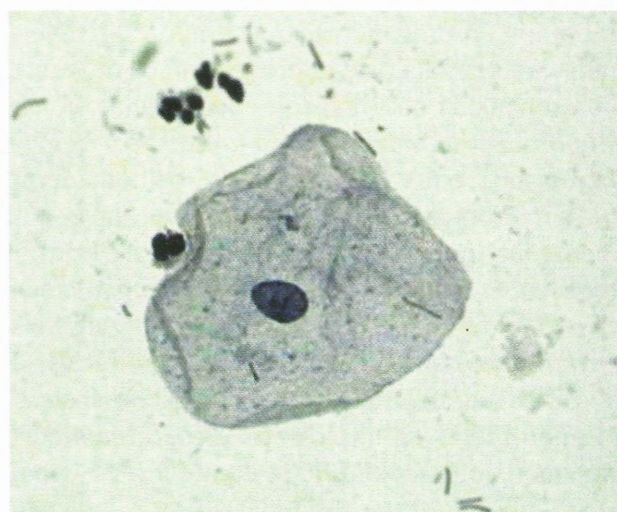



Figura 6.1 – Microbiota lactobacilar. Bacilos retos e relativamente longos que causam citólise das células escamosas intermediárias. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

978-85-4120-024-0

Gardnerella vaginalis, e anaeróbios, que não degradam esse composto. Não foi demonstrado que os lactobacilos, por si só, possam causar vaginite, embora sejam responsáveis por corrimento vaginal quando a citólise é pronunciada, denominada vaginose citolítica. Uma grande proliferação de lactobacilos é observada normalmente em situações que determinam um maior acúmulo de glicogênio, como gravidez, fase lútea do ciclo menstrual, período perimenopáusico e uso de alguns tipos de anovulatórios hormonais[12,13].

A vaginose ou vaginite citolítica, segundo Cibley e Cibley[14], é uma condição mal diagnosticada e confundida com candidíase vulvovaginal. Isso porque as mulheres apresentam sintomas como prurido, dispareunia, disúria vulvar, leucorreia branco-leitosa e pH entre 3,5 e 4,5, os quais se intensificam na fase lútea. No esfregaço citológico, observam-se grande quantidade de lactobacilos, poucos leucócitos e evidência de citólise. Não são detectados agentes etiológicos, como *Candida* spp., na citologia, bem como na bacterioscopia e na cultura. O tratamento consiste basicamente em elevar o pH vaginal, que pode ser obtido com a realização de duchas vaginais 2 a 3 vezes/semana com bicarbonato de sódio.

Microbiota bacteriana mista

Mulheres que apresentam epitélio vaginal com predomínio de células parabasais, ou seja, pobre em glicogênio (pré-menarca, pós-menopausa ou pós-parto, por exemplo), normalmente apresentam microbiota bacteriana mista, o que significa colonização por uma ampla variedade de espécies bacterianas, como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., representantes da família *Enterobacteriaceae*, especialmente *Escherichia coli*, além de diversas espécies de cocos ou bacilos anaeróbios[10,11]. No esfregaço citológico, a microbiota bacteriana mista é observada como uma mistura de cocos e bacilos (Figura 6.2). Por ocorrerem como reflexo de mudanças hormonais, não são observadas manifestações clínicas ou ainda inflamatórias nos esfregaços. No entanto, essas alterações podem ser observadas, sendo, nesse caso, consideradas decorrentes de processos inflamatórios e/ou infecciosos de outras etiologias.

Microbiota cocoide

Ocorre também em decorrência de situações nas quais o epitélio escamoso é pobre em glicogênio.

Os cocos gram-positivos (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., além de espécies anaeróbias) estão presentes apenas como parte da microbiota, não sendo responsáveis por alterações clínicas. A maioria das espécies de cocos gram-negativos pode estar presente também como parte da microbiota (*Neisseria* spp., *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp., espécies anaeróbias como *Veilonella* spp. e *Megasphaera* spp., entre outros), com exceção da *Neisseria gonorrhoeae*, agente etiológico de cervicite gonocócica[11].

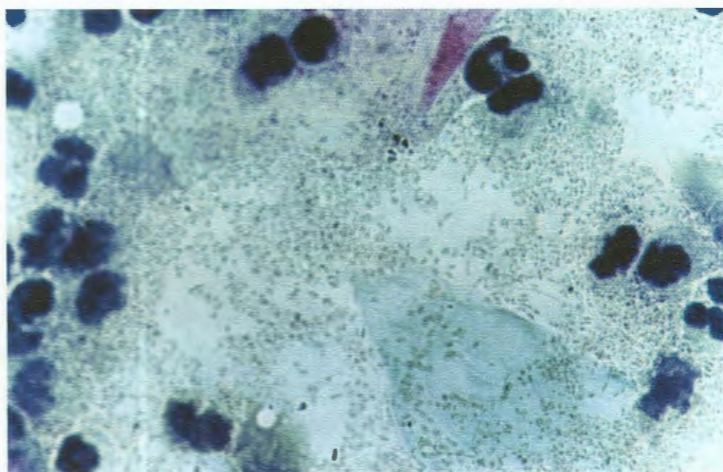



Figura 6.2 – Microbiota bacteriana mista. Caracteriza-se pela observação de uma mistura de cocos e bacilos no esfregaço citológico. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (1.000x).

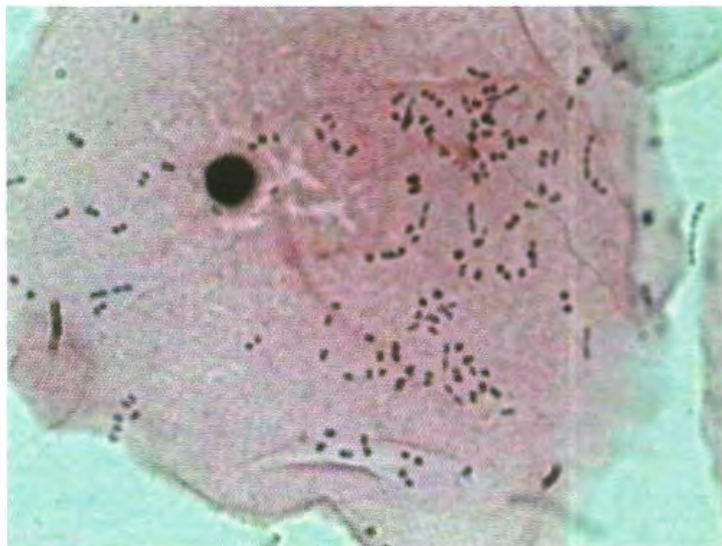



Figura 6.3 – Microbiota bacteriana cocoide. Caracteriza-se pela observação de um predomínio de cocos dispostos em aglutinados ou em correntes no esfregaço citológico. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (1.000×).

A citologia mostra esfregaços com bactérias dispostas em aglutinados ou em correntes e não faz diagnóstico específico com respeito às espécies e aos gêneros, referindo-se apenas como presença de bactérias com morfologia cocoide (Figura 6.3)[1,2,9]. Havendo a necessidade de diagnóstico mais específico, como na suspeita de gonorreia, bacterioscopia (gram) e cultura devem ser realizadas. Para os outros cocos, a bacterioscopia é suficiente, devendo ser realizada somente quando há necessidade de confirmar importante alteração na microbiota vaginal.

Micoplasmas

São os menores organismos de vida livre conhecidos. A característica mais importante que distingue os micoplasmas de todos os outros procariotos é a completa ausência de parede celular, propriedade que os coloca em uma divisão separada, *Tenericutes*, uma das quatro divisões dentro do reino *Procaryotae*. Essa divisão inclui a classe *Mollicutes*, constituída de oito gêneros, dentre os quais *Mycoplasma* e *Ureaplasma* possuem maior interesse na clínica médica[15].

O gênero *Mycoplasma* contém diversas espécies já isoladas do homem, algumas já relacionadas com infecção. Um estudo recente definiu o gênero *Ureaplasma* como sendo constituído por duas espécies: *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*, consideradas anteriormente como biovariedades 2 ou A e biovariedade 1 ou B, respectivamente, da espécie *U. urealyticum*[16]. Entretanto, essa diferenciação é pouco difundida entre os médicos. Para a grande maioria deles e para os laboratórios clínicos, *U. urealyticum* representa as duas espécies, principalmente pelo fato de a diferenciação delas só poder ser feita por meio de técnicas moleculares.

A maioria dos micoplasmas infecta homens e animais, aderindo firmemente à mucosa epitelial do trato respiratório ou urogenital, fato esse que os protege de serem eliminados pelas secreções. A união do micoplasma com a célula hospedeira ocasiona a maior concentração de produtos tóxicos excretados pelo microrganismo, irritando e lesando os tecidos envolvidos. A falta de parede celular facilita o contato direto da membrana plasmática do micoplasma com a célula hospedeira[16].

M. hominis e *Ureaplasma* spp. aparecem como verdadeiros comensais pertencentes à microbiota dos tratos geniturinários masculino e feminino, sendo altamente prevalentes no trato genital de mulheres sexualmente ativas. A presença em indivíduos assintomáticos, aliada ao fato da difícil obtenção de amostras do sítio afetado, como as tubas uterinas, dificulta a aceitação desses agentes como responsáveis por doenças. No entanto, existem evidências de que essas espécies têm papel etiológico em algumas doenças

dos tratos genitais masculino e feminino. *Ureaplasma* spp. é mais conhecido por estar envolvido com uretrites não gonocócicas no homem, ao passo que *M. hominis* parece estar relacionado com vaginose bacteriana e DIP. Ambos já foram isolados do sangue de mulheres com febre pós-parto ou pós-aborto[15,16].

Por não possuírem parede celular, os micoplasmas não são visíveis em preparações coradas, especialmente o gram, o que dificulta o diagnóstico por técnicas de pesquisa direta do microrganismo. Além da cultura, *M. hominis* e *U. urealyticum* podem ser detectados por técnicas imunológicas, como as reações imunoenzimáticas (ELISA) e de biologia molecular, como a PCR[15,16].

Pesquisadores demonstraram que agregados granulares observados na superfície das células do epitélio vaginal, conferindo aspecto sujo aos esfregaços corados com Papanicolaou, podem estar relacionados com a presença de micoplasmas[17]. É muito difícil, porém, correlacionar aspectos microscópicos com micoplasma, principalmente em objetiva de 40×, uma vez que, inclusive, suas colônias em meios de cultura são microscópicas.

De maneira geral, quando a microbiota vaginal não é lactobacilar, existe a necessidade de utilização de microscopia de imersão unicamente para a melhor diferenciação da morfologia bacteriana.

DETECÇÃO CITOLÓGICA DE AGENTES DE DST E OUTROS AGENTES INFECCIOSOS

O Sistema Bethesda identifica cinco categorias de organismos em citologia cervical: (1) *Trichomonas vaginalis*; (2) organismos fúngicos, morfologicamente compatíveis com *Candida* spp.; (3) mudança na flora sugestiva de vaginose bacteriana; (4) bactérias morfologicamente consistentes com o *Actinomyces* spp. e (5) alterações celulares compatíveis com o herpes-vírus simples. A infecção pelo HPV é tratada à parte por conta de seu envolvimento na carcinogênese cervical[1].

Vaginose bacteriana (VB)

Desequilíbrio do ecossistema vaginal, caracterizado por substituição da microbiota lactobacilar normal por concentrações relativamente grandes de outras bactérias, principalmente anaeróbias. Em relação à etiologia, apresenta alguns aspectos confusos a serem esclarecidos. Alguns gêneros bacterianos estão mais comumente relacionados com VB, como *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Bacteroides* spp. e *Mycoplasma hominis*. Entretanto, em estudos atuais utilizando técnicas de biologia molecular baseadas em PCR, outros gêneros, como *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* spp., *Eggerthella* spp. e *Leptotrichia/Sneathia* spp., foram detectados em presença mais abundante em mulheres com VB comparadas às saudáveis[11,12].

Essa condição afeta milhões de mulheres anualmente e está associada a diversas situações adversas à saúde, como trabalho de parto e parto prematuros, DIP, endometrite pós-parto ou pós-aborto, além de aumento da suscetibilidade para infecções por diversos patógenos, como *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida* spp., HPV, HSV-1 e HIV-2[18]. É considerada, pela OMS, uma infecção de possível transmissão sexual, sendo a causa mais comum de corrimento genital em mulheres nos países em desenvolvimento. O corrimento vaginal é homogêneo, fluido, amarelado ou acinzentado, com ausência de prurido, queimação ou sintomas urinários. De maneira geral, acomete mulheres em idade reprodutiva e com menor frequência aquelas nas fases pré-puberal e pós-menopáusica, indicando possível influência dos hormônios sexuais na sua patogênese. Não se observa modificação do colo, da vagina ou da vulva, pois, na VB, não existe processo inflamatório associado. Essa é a razão para que essa patologia seja designada como vaginose, e não vaginite. Hiperemia, fissuras ou alterações celulares inflamatórias sugerem associação com outros agentes[11,12,18].

Na VB, a proliferação maciça da *G. vaginalis* e de bactérias anaeróbias é acompanhada de aumento na produção de aminas derivadas do metabolismo das bactérias (putrescina, cadave-

rina e trimetilamina). Quando ocorre elevação do pH vaginal, tais aminas volatilizam-se e produzem odor anormal, semelhante ao de peixe ou de amônia. Essas aminas têm ação citotóxica, ocasionando o corrimento genital. O odor é principalmente ruim após as relações sexuais, pois sangue e sêmen são alcalinos, contribuindo para a volatilização das aminas. Geralmente o pH vaginal está maior ou igual a 4,8 na VB[11,12].

O esfregaço citológico de mulher com VB caracteriza-se por ausência ou escassez de lactobacilos, em decorrência da elevação do pH vaginal, e de leucócitos, possivelmente em razão da liberação de succinato desidrogenase. Alguns autores, porém, relatam casos de VB com leucócitos aumentados[19]. Concomitantemente, ocorre cariopicnose, ou seja, exacerbação da maturação celular, que se reflete em descamação de uma grande quantidade de células escamosas superficiais. As células têm aparência normal, cianofílicas ou eosinofílicas, cariopicnóticas, citoplasmas finos e transparentes. As bactérias encontram-se dispersas como poeira entre as células epiteliais descamadas e também recobrindo essas células. Os cocobacilos acumulam-se na superfície celular e em suas bordas, obscurecendo a membrana celular e deixando os limites celulares imprecisos (Figuras 6.4 e 6.5), o que caracteriza as *clue cells*, no caso da *Gardnerella vaginalis*, e as *comma cells*, no caso de *Mobiluncus* spp.[1,2,9,10].

A cultura pode ser realizada apenas para confirmação, e não para diagnóstico, já que vários dos microrganismos envolvidos na VB são considerados membros da microbiota vaginal[11].

G. vaginalis foi denominada inicialmente como *Haemophilus vaginalis*. É um bacilo muito curto ou cocobacilo, anaeróbio facultativo e gram variável em esfregaços corados por essa metodologia. Pode ser observada na microbiota anorretal de crianças e adultos saudáveis de ambos os sexos. Também faz parte da microbiota endógena vaginal em 30 a 70% das mulheres em idade reprodutiva e pode ser isolada da uretra de parceiros masculinos de mulheres com VB. Entretanto, sua associação com doença em homens é questionável[20].

Clue cells, células-alvo ou células-guia são células escamosas maturas, principalmente superficiais, com microrganismos aderidos à sua superfície, recobrindo as bordas celulares (Figura 6.6). Representam a capacidade de adesão da *G. vaginalis* a células escamosas. A observação das *clue cells*, porém, é dependente de vários fatores, como o tipo de microscópio utilizado na análise, da representatividade da amostra vaginal e, ainda, da competência do observador. Cocos e bacilos difteroides aderidos às células escamosas podem mimetizar essa bactéria em pequeno aumento microscópico[1,2,9,10]. Assim, todos esses fatores reforçam as evidências de que as *clue*

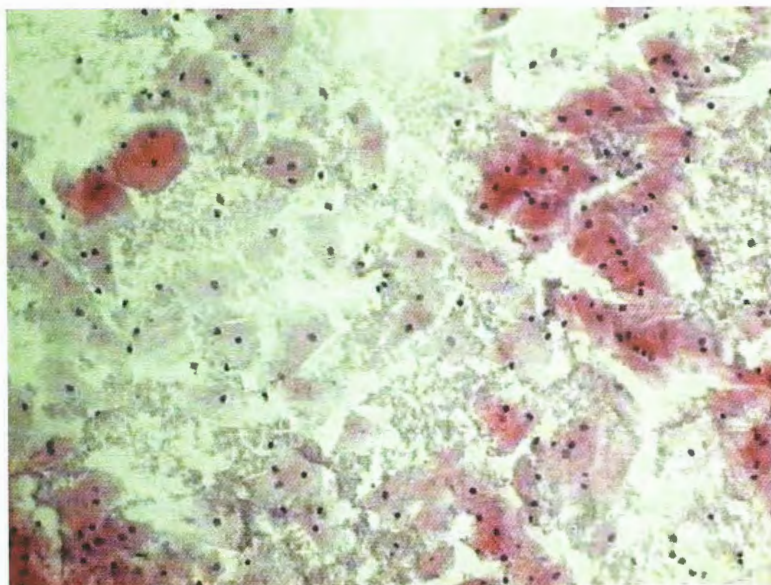
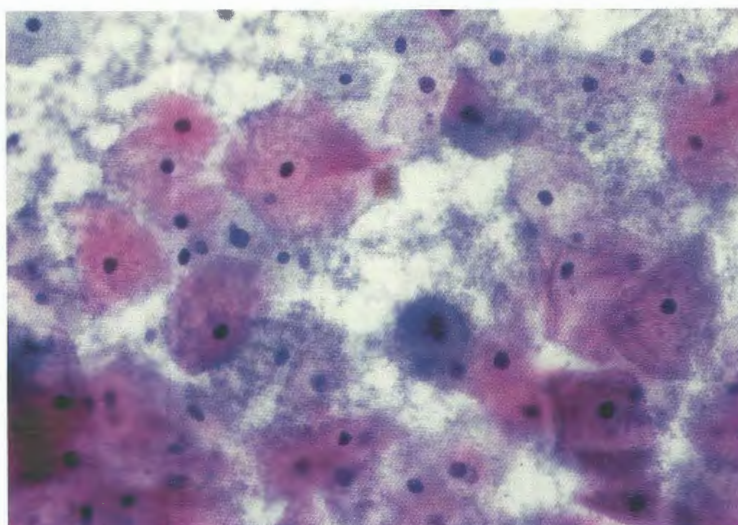



Figura 6.4 – Vaginose bacteriana. Descamação de uma grande quantidade de células escamosas apresentando cariopicnose. As bactérias encontram-se dispersas como poeira entre as células epiteliais descamadas, recobrindo-as. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (100×).

Figura 6.5 – Vaginose bacteriana. Ausência ou escassez de lactobacilos e de leucócitos, concomitantemente a cariopicnose, com descamação de uma grande quantidade de células escamosas superficiais. As células têm aparência normal, eosinofílicas, citoplasmas finos e transparentes. As bactérias encontram-se dispersas como poeira entre as células epiteliais descamadas, recobrindo-as. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

cells não são muito específicas para o diagnóstico de VB, podendo, inclusive, estar ausentes em mulheres com essa patologia.

A origem do nome *Mobiluncus* spp. vem de *mobile* = capaz de movimento; *uncus* = relativo a anzol ou gancho; curvo e móvel. Apresentam-se isolados ou aos pares, assemelhando-se a "voos de gaivotas". São bacilos curvos com extremidades afiladas, em forma de vírgula, anaeróbios estritos, móveis e com reação variável ao gram (são gram-lábeis ou gram-negativos). Duas espécies, *M. curtisii* e *M. mulieris*, são identificadas em humanos. Colonizam o trato genital feminino em baixos números, mas podem ser abundantes em mulheres com VB. Alguns estudos mostraram a presença de *Mobiluncus* spp. em comunidades bacterianas vaginais somente quando a VB estava presente. Entretanto, outros autores discutem a participação desse gênero como marcador de VB[12]. O relato da presença de *Mobiluncus* spp. em pacientes com VB justifica-se pelo fato de o *M. curtisii* ser intrinsecamente resistente ao metronidazol, que é o tratamento de escolha para VB. Assim, outro tratamento deve ser adotado nos casos em que existe envolvimento dessa bactéria[11,12].

As *comma cells* são células escamosas maturas, principalmente intermediárias, com microrganismos aderidos a sua superfície, recobrindo as bordas celulares, dando um aspecto de "ta-

978-85-4120-024-0

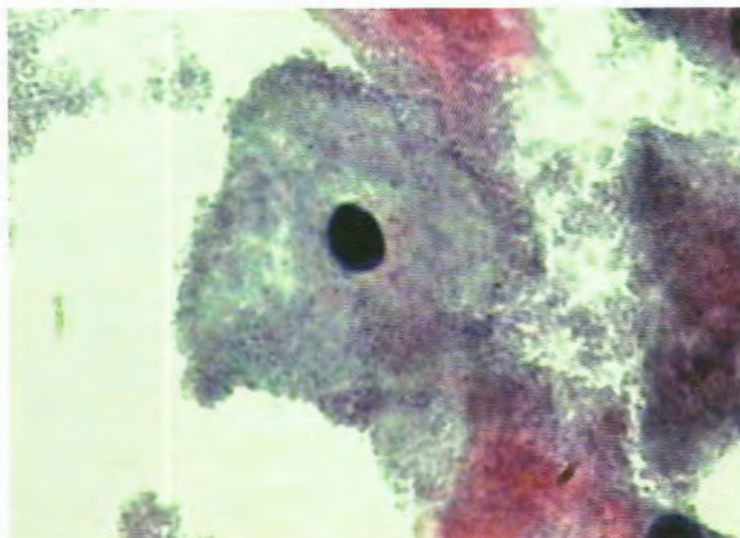



Figura 6.6 – *Clue cells*. São células escamosas maturas, principalmente do tipo superficiais, com cocobacilos sugestivos de *Gardnerella vaginalis* aderidos a sua superfície, recobrindo as bordas celulares, dando aspecto de "células em alvo". Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (1.000×).

pete de pelo" (Figura 6.7). Representam também a capacidade de adesão dos *Mobiluncus* spp. a células escamosas. A observação das *comma cells* é dependente dos mesmos fatores que para as *clue cells*. Também não são muito específicas para o diagnóstico de VB e podem estar ausentes em mulheres com essa patologia[1,2,9,10].

Mobiluncus spp. não produzem putrescina e cadaverina, mas apenas trimetilamina, que também ocasiona corrimento com odor desagradável. Clinicamente, comporta-se de forma muito semelhante à *G. vaginalis*. Ambos têm aspecto semelhante na citologia em pequenos aumentos microscópicos, de modo que a diferenciação entre eles pode ser somente percebida algumas vezes em objetiva de 40× e com mais precisão em imersão, principalmente em campos microscópicos que apresentem as bactérias mais espalhadas entre as células epiteliais, permitindo a diferenciação morfológica (Fig. 6.8)[16].

Actinomyces spp.

Microrganismos cujo *filum* desenvolveu-se paralelamente aos fungos e às bactérias. Possuem morfologia variável, podendo apresentar-se como bacilos ramificados até formas cocobacilares. São gram-positivos, anaeróbios ou anaeróbios facultativos[16]. Não fazem parte da microbiota cérvico-vaginal. As espécies mais comuns que podem acometer o trato genital feminino são

Figura 6.7 – *Comma cells*. São células escamosas maturas, principalmente do tipo intermediárias, com bacilos curvos sugestivos de *Mobiluncus* spp. aderidos em sua superfície, recobrindo as bordas celulares, dando um aspecto de "tapete de pelo". Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (1.000×).

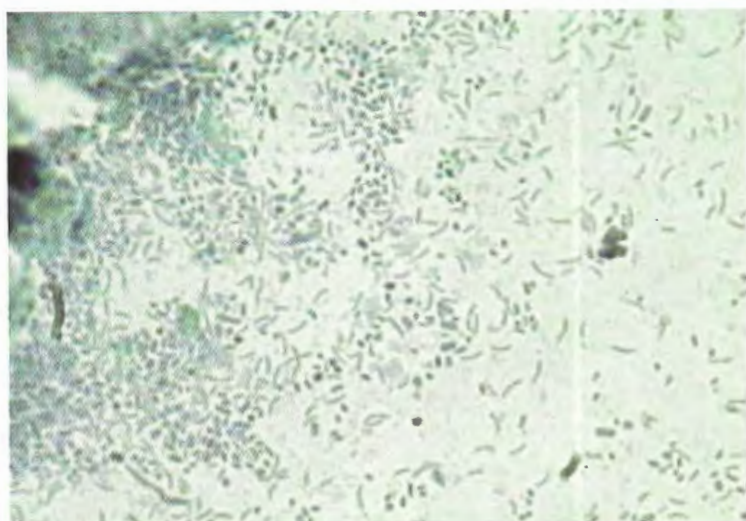



Figura 6.8 – *Mobiluncus* spp. e microbiota bacteriana mista. Campo microscópico com bactérias espalhadas entre as células epiteliais, permitindo a diferenciação entre os bacilos curvos, sugestivos de *Mobiluncus* spp., e os demais bacilos e também cocos, característicos de microbiota mista. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (1.000×).

978-85-4120-024-0

A. israeli e *A. naeslundii*, que habitam normalmente a cavidade oral, a orofaringe e o trato gastrintestinal, onde raramente são patológicos. Em condições normais, *Actinomyces* não cruza barreiras mucosas, mas pode causar infecções genitais femininas ascendentes, principalmente em casos de usuárias de DIU, tampões vaginais esquecidos, gazes cirúrgicas etc. Essas infecções ascendentes em usuárias de DIU são favorecidas pelas erosões por ele provocadas, aliadas à tensão diminuída de oxigênio uterina. As usuárias de DIU podem ainda apresentar esse microrganismo no trato urinário[1,2,9,10,16].

Actinomyces spp. raramente causam infecções por vias hematogênica e linfática ou por disseminação. Apresentam-se geralmente como uma infecção comensal nas usuárias de DIU, mas que é capaz de invasão de tecidos e pode provocar DIP, esterilidade ou morte. Em torno de 40% das mulheres que chegam a hospitais com suspeita de DIP usam DIU. Quando sintomáticas, as mulheres apresentam corrimento amarelado, leitoso e fétido[21].

No esfregaço citológico, *Actinomyces* spp. são observados menos comumente isolados e principalmente em agregados (tufos de bactérias), denominados "ouriço do mar" (Figura 6.9)[1,2,10], os quais demonstram boa segurança diagnóstica, mas não diagnóstico definitivo. Pode-se observar ainda abundante infiltrado de polimorfonucleares

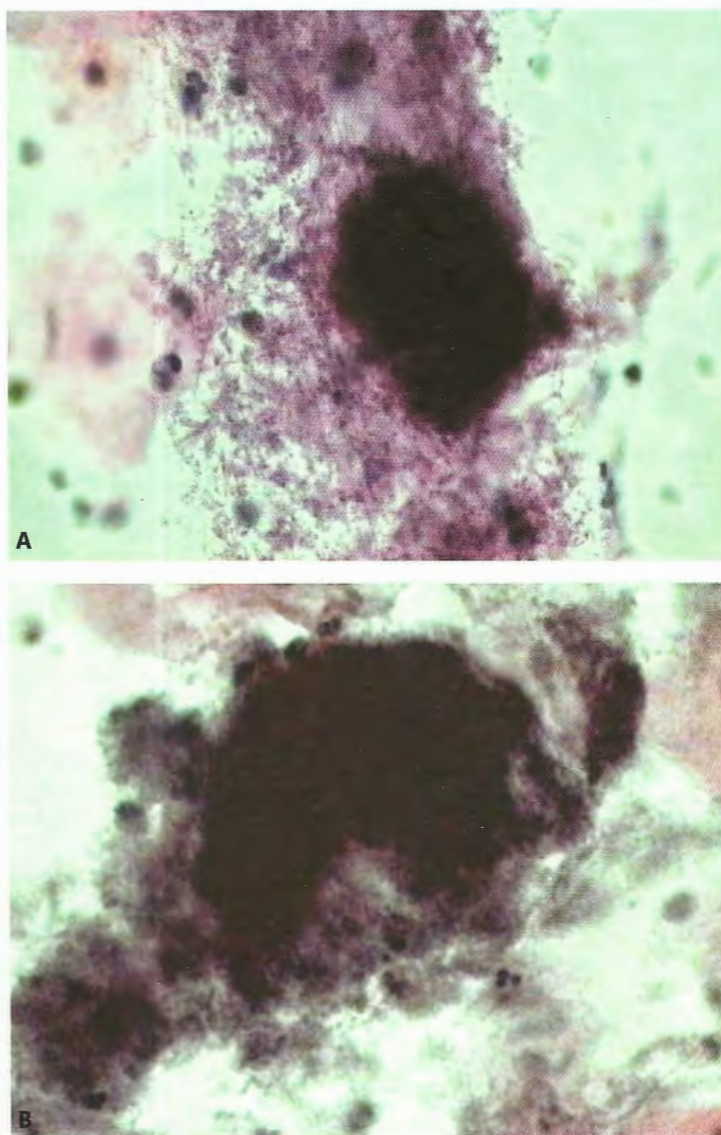



Figura 6.9 – *Actinomyces* spp. (*A* e *B*) Agregados bacterianos característicos do tipo "tufos de bactérias", denominados "ouriço do mar". Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

978-85-4120-024-0

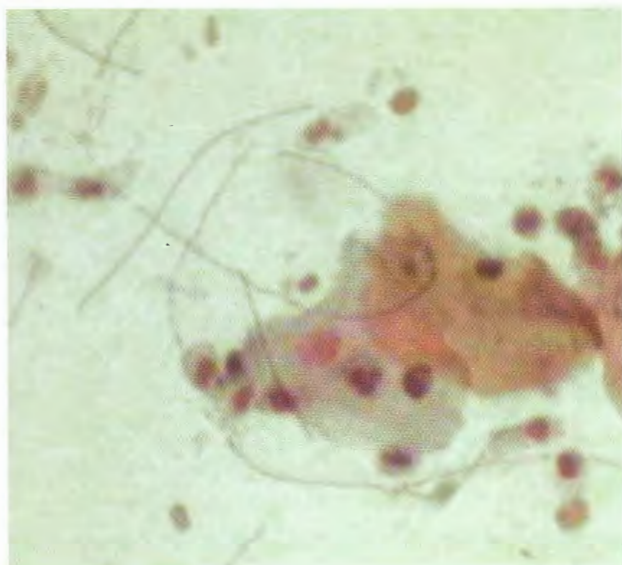



Figura 6.10 – *Leptothrichia* spp. Bacilos longos em forma de filamentos, que se assemelham a finos pelos ou fios de cabelo, que apresentam curvaturas que lembram as letras S, C e U. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

Sorotipos L1, L2, L2a, L2b e L3 causam linfogranuloma venéreo, DST sistêmica que leva ao aparecimento de lesões ulceradas nos genitais externos e linfadenopatia inguinal e/ou femoral[16,22].

Os sorotipos D-K causam uretrites não gonocócicas no homem e cervicite em mulheres, o que pode ocasionar disúria e secreção uretral clara ou esbranquiçada, ou vaginal, mucopurulenta, e sangramento pós-coito. Uretrite, proctite e conjuntivite podem ser observadas em homens e mulheres. Boa parte das infecções é assintomática e, por isso, não é detectada, o que pode resultar em infecções ascendentes, como epididimite em homens e endometrite, salpingite, DIP e peri-hepatite em mulheres. Alguns autores demonstram que o acesso ao trato genital superior pode ser conseguido pela ligação com o esperma[23] ou pela movimentação dos fluidos genitais[24]. Entretanto, o exato mecanismo pelo qual *Chlamydia* spp. atingem o trato genital superior ainda é desconhecido. As manifestações das infecções genitais superiores em mulheres são sangramento uterino irregular, desconforto pélvico ou dor abdominal e podem resultar em infertilidade tubária ou gravidez ectópica. Essas infecções tornam-se ainda mais importantes ao considerar que os recém-natos de mães infectadas apresentam maiores riscos de desenvolvimento de infecções oftálmicas e do trato respiratório, além de prematuridade[22,23,24].

As infecções urogenitais por *C. trachomatis* são incluídas entre as DST mais frequentes no mundo. A transmissão acontece por meio de parceiro com uretrite, prostatite ou epididimite por *Chlamydia*. O sítio primário da infecção é representado pelas células do epitélio colunar da cérvice uterina e epitélio urogenital no ho-

Figura 6.11 – Microbiota bacilar. Predomínio de bacilos curtos e grossos. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (1.000×).

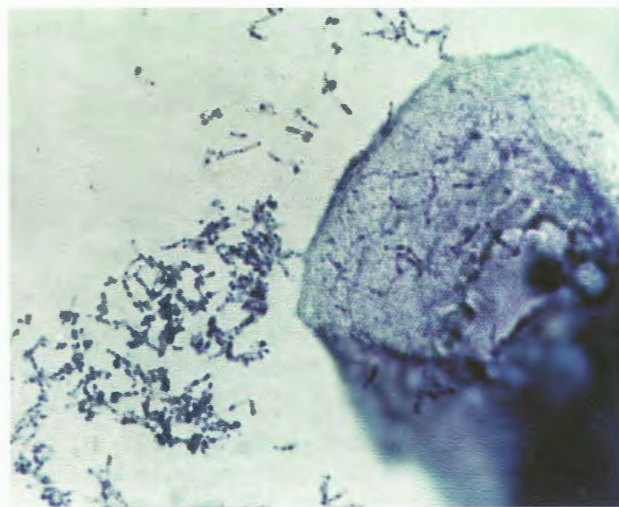



Figura 6.12 – Microbiota bacilar constituída por bacilos difteroides. Bacilos tipo "palito de fósforo de duas cabeças". Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (1.000×).

mem. A infecção ocorre mediante minúsculas escoriações, infectando células endocervicais e metaplásicas, sendo a JEC e a endocérvice as mais atingidas[16,22].

O ciclo de desenvolvimento da *C. trachomatis* ocorre dentro da célula hospedeira, garantindo assim meio ambiente livre de competição com outros microrganismos, evadindo do sistema imune e com rico aporte de nutrientes pré-elaborados. Possui duas formas: corpos elementares (CE), que são menores, extracelulares e representam a forma infecciosa da *C. trachomatis,* que penetra na célula hospedeira por fagocitose; e corpos reticulados (CR), que são maiores, extracelulares e não infecciosos, sendo metabolicamente ativos e com intensa produção de RNA[16].

O ciclo inicia-se com a ligação do CE na célula hospedeira; no caso da cérvice uterina, as células endocervicais não ciliadas e as células metaplásicas, seguidas de penetração por endocitose, e permanência no seu interior em vacúolos citoplasmáticos. Nesses vacúolos, os CE organizam-se, aumentam de tamanho e formam os CR, que são visualizados nos esfregaços citológicos como inclusão eosinofílica no interior do vacúolo citoplasmático. Os CR sofrem fissão binária para formar novos corpúsculos, reorganizam-se novamente em CE e são liberados da célula mediante lise (exocitose) para infectar novas células (Figura 6.13). As manifestações clínicas resultam da destruição direta das células na replicação e também em decorrência da resposta inflamatória do hospedeiro.

No esfregaço citológico, são observadas inclusões citoplasmáticas em material endocervical ou uretral, mais comumente pequenos elementos dentro de um único vacúolo citoplasmático nas células colunares ou metaplásicas. Posteriormente, são visualizados múltiplos vacúolos com inclusão eosinofílica, que representam os CR, além de infiltrado leucocitário (Figura 6.14). Podem ainda ser observadas células, principalmente metaplásicas com aspecto de "mordedura de traça", que apresentam citoplasma com microvacúolos, algumas vezes rompidos. Essas células possivelmente representam a lise celular para liberação de novos CE que infectarão novas células. As células infectadas podem ain-

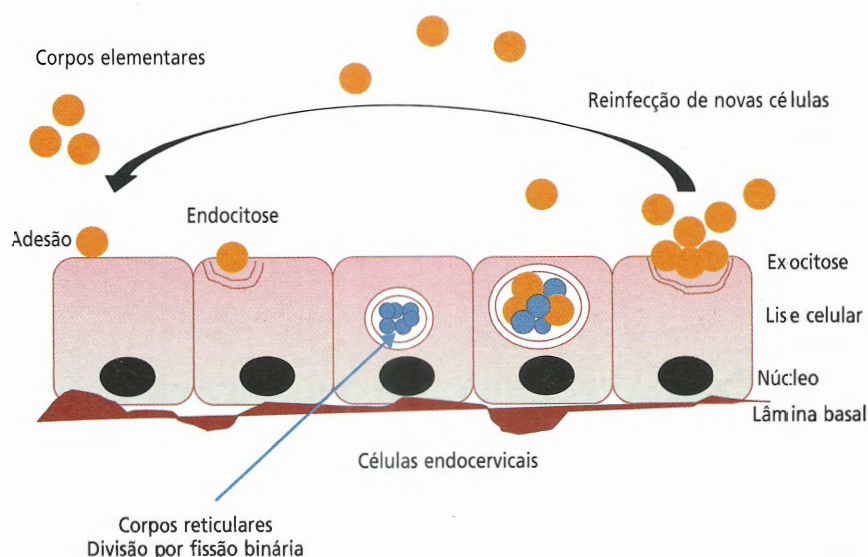



Figura 6.13 – Ciclo de desenvolvimento de *Chlamydia trachomatis*. Possui duas formas: CE, que são menores, extracelulares e representam a forma infecciosa da *C. trachomatis*, que penetra na célula hospedeira por fagocitose; e CR, que são maiores, extracelulares e não infecciosos, sendo metabolicamente ativos e com intensa produção de RNA. O ciclo inicia-se com a ligação do CE na célula hospedeira; no caso da cérvice uterina, as células endocervicais não ciliadas e as células metaplásicas, seguidas de penetração por endocitose, e permanência no seu interior em vacúolos citoplasmáticos. Nesses vacúolos, os CE organizam-se, aumentam de tamanho e formam os CR, que são visualizados nos esfregaços citológicos como inclusão eosinofílica no interior do vacúolo citoplasmático. Os CR sofrem fissão binária para formar novos corpúsculos, reorganizam-se novamente em CE e são liberados da célula mediante lise (exocitose) para infectar novas células.

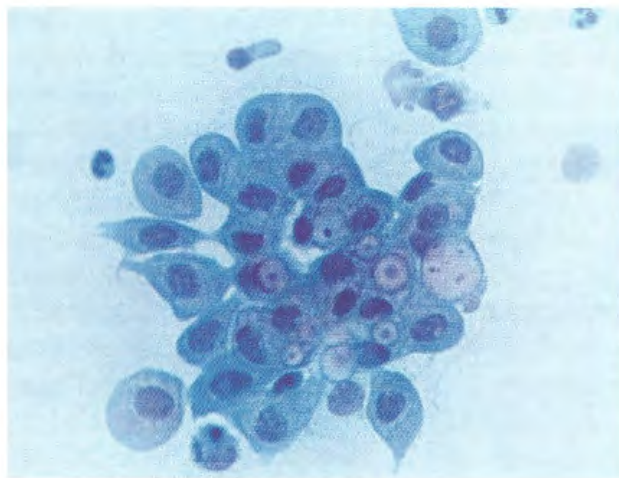



Figura 6.14 – *Chlamydia trachomatis.* Vacúolos citoplasmáticos com inclusões eosinofílicas em células metaplásicas. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

da apresentar aumento nuclear, multinucleação e hipercromasia[1,9,10,25].

Existem controvérsias quanto à aplicação da citologia na detecção da cervicite por *C. trachomatis* entre diferentes autores e diferentes citologistas. Isso ocorre porque essa bactéria nem sempre produz anormalidades citológicas e também em razão de os vacúolos citoplasmáticos apresentarem natureza inespecífica, ou seja, podem ou não ser relacionados com a presença da bactéria. Desse modo, a sensibilidade e a especificidade da citologia para a detecção dessa infecção podem não ser satisfatórias. Um diagnóstico definitivo exige cultura microbiológica, testes de imunofluorescência com antígeno específico, ELISA ou PCR.

Candidíase vulvovaginal (CVV)

CVV é uma patologia ocasionada pelo crescimento anormal de fungos do tipo levedura no trato genital feminino. Trata-se de uma infecção da vulva e da vagina, causada por leveduras comensais que habitam a mucosa vaginal, bem como as mucosas digestiva e respiratória, principalmente *Candida albicans*. Essas leveduras podem tornar-se patogênicas quando o sítio de colonização do hospedeiro passa a ser favorável para o seu desenvolvimento[26].

A CVV é causada, predominantemente, por leveduras do gênero *Candida*, sendo 80 a 90% dos casos por *C. albicans* e 10 a 20% por outras espécies chamadas de espécies não *albicans (C. tropicalis, C. glabrata, C. krusei, C. parapsilosis, C. pseudotropicalis, C. lusitânia). C. glabrata* é a segunda espécie em frequência nas CVV. Leveduras de outros gêneros, porém, também podem causar essa infecção, como *Saccaharomyces cerevisiae*, *Rhodutorula* spp. e *Trichosporon* spp. Estudos mais recentes demonstram que, em algumas populações, a frequência de isolamento de espécies não *albicans* aumentou[26,27].

A infecção caracteriza-se por prurido, ardor, dispareunia e corrimento vaginal em grumos, semelhante à nata do leite. Com frequência, vulva e vagina estão edemaciadas e hiperemiadas, algumas vezes acompanhadas de ardor ao urinar e sensação de queimadura. As lesões podem estender-se pelo períneo e pelas regiões perianal e inguinal. O corrimento é, em geral, branco e espesso, inodoro e, quando depositado nas vestes a seco, tem aspecto farináceo. Em casos típicos, aparecem, nas paredes vaginais e no colo uterino, pequenos pontos branco-amarelados. Os sintomas intensificam-se no período pré-menstrual, quando a acidez da vagina aumenta[16,26,27].

A principal fonte de leveduras vaginais é o trato gastrintestinal, mediante um processo chamado de transmissão endógena. Elas são veiculadas das regiões anal e perianal para a vagina por autoinoculação, onde se adaptam e se desenvolvem. Por meio da ação de enzimas como proteases e hidrolases, as leveduras que chegam à vagina penetram no epitélio escamoso, ali permanecendo albergadas, podendo causar distúrbios imediatos ou constituir-se em reservatórios para a ocorrência de infecção sintomática ou reinfecções posteriores. A transmissão sexual também é aceita. Segundo a OMS, a CVV é uma infecção de possível transmissão sexual[28].

Atualmente, a CVV é a segunda infecção genital mais frequente nos EUA e no Brasil, representando 20 a 25% dos corrimentos vaginais de natureza infecciosa, precedida apenas da vaginose bacteriana. Na Europa, é a primeira

causa de vulvovaginite. Estima-se que aproximadamente 75% das mulheres adultas apresentem pelo menos um episódio de CVV em sua vida. Destas, 40 a 50% vivenciarão novos surtos e 5% atingirão o caráter recorrente (CVVR), definido como a ocorrência de quatro ou mais episódios sintomáticos no período de 12 meses. Ao contrário das mulheres que têm episódios esporádicos de CVV, aquelas com doença recorrente não se beneficiam da diminuição na frequência de episódios sintomáticos com o passar da idade[26,27,28].

Raramente fatores predisponentes dos hospedeiros são detectados nas pacientes com CVVR, dificultando em muito seu manejo. A patogênese da CVVR está sob investigação, não sendo observada a elevação na resistência a antifúngicos de espécies de *Candida* na maioria dos casos. Acredita-se que a CVVR esteja relacionada com depressão nos processos imunes da mucosa normal, o que permitiria certa "tolerância" da mucosa ao microrganismo[26].

Tanto fatores locais como sistêmicos podem contribuir para a invasão tecidual por *Candida* spp. Sua multiplicação intensa no canal vaginal é favorecida por uma série de fatores predisponentes. Do ponto de vista do hospedeiro, a colonização prévia por levedura e a posterior diminuição da capacidade de resposta imunológica observada em doenças imunossupressoras, diabetes melito, gestantes e usuárias crônicas de corticoides parecem favorecer o desenvolvimento da infecção. A utilização de antibióticos pode incrementar tanto a colonização quanto a infecção por *Candida* spp.[26,27,28].

A infecção vaginal por *C. albicans*, além de estar associada a situações de debilidade do hospedeiro, também é favorecida quando o teor de glicogênio do meio vaginal está elevado, o que, consequentemente, diminui o pH local e propicia o desenvolvimento da infecção, diferente do que ocorre com a maioria dos outros microrganismos potencialmente infectantes para o ambiente vaginal. Qualquer alteração dos níveis de glicose, especialmente em situações de hiperglicemia, e qualquer estado em que ocorre elevação do glicogênio vaginal podem desencadear CVV. O excesso de glicogênio aumenta o substrato nutritivo dos fungos, promovendo o incremento na sua capacidade de adesão. Assim, a CVV apresenta dependência hormonal e é comum em mulheres no menacme e rara naquelas na pré-menarca e na pós-menopausa[26].

Dez a cinquenta por cento das mulheres em idade reprodutiva e assintomáticas podem albergar fungos na vagina em pequenas quantidades, representando o estado comensal da levedura, sendo necessárias alterações no ambiente vaginal para que ela exerça sua virulência e a paciente desenvolva CVV[26,27].

C. albicans é um fungo dimórfico que se apresenta sob formas leveduriformes (blastoconídios) no estado saprofítico, ou seja, associado à colonização assintomática, ou como formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), observadas em processos patogênicos. Existem evidências de que as espécies não *albicans*, em especial *C. glabrata*, sejam monomórficas, sendo incapazes de formar micélios *in vivo*. Em decorrência disso, apresentam apenas a morfologia de blastoconídios tanto para colonização quanto para a infecção, e as pseudo-hifas são as formas infectantes apenas da *C. albicans*[16].

Como a cérvice e a vagina apresentam ecossistema complexo, a simples presença de leveduras no esfregaço citológico não indica doença. Assim, o esfregaço citológico pode ou não revelar alterações inflamatórias nas células escamosas.

As alterações celulares inflamatórias decorrentes de CVV são mais frequentes nas células escamosas intermediárias, mas normalmente são sinais inespecíficos[1,2,10]. As alterações citoplasmáticas mais comumente observadas são vacúolos citoplasmáticos, pseudoeosinofilia, halos perinucleares, apagamentos de bordas citoplasmáticas e, menos comumente, descamação de células parabasais em razão da erosão. As alterações nucleares são aumento nuclear, com cromatina mostrando aumento de afinidade tintorial e tendência a se depositar na periferia, conferindo muitas vezes contorno discretamente irregular aos núcleos, que podem se apresentar também degenerados. Os esfregaços podem apresentar ainda leucócitos PMN, sendo possível observar no fundo deles vários núcleos degenerados desses leucócitos[1,2,9,10]. Nos casos de colonização,

geralmente não são observadas alterações celulares inflamatórias, pois as mulheres nessa situação são assintomáticas.

No esfregaço citológico, é possível o reconhecimento do agente na forma de pseudo-hifas, leveduras ou ambas. As leveduras têm forma ovoide ou arredondada, com 3 a 6 μm de diâmetro. Apresentam-se de cor rosada ao Papanicolaou e podem estar rodeadas por pequeno halo esbranquiçado, quando sobre as células escamosas. Ocorrem isoladas ou em pequenos grupos na periferia ou sobre as células escamosas ou, ainda, em acúmulos juntos aos leucócitos e aos detritos celulares. Podem também ser observadas leveduras em brotamento (Figura 6.15). As formas filamentosas, representadas por pseudo-hifas e hifas verdadeiras, dificilmente diferenciadas entre si em esfregaços cérvico-vaginais, têm aspecto de filamentos retos ou encurvados, de comprimentos variáveis, geralmente segmentados, como bambu, também de cor rosada nos esfregaços corados por Papanicolaou (Figura 6.15). As pseudo-hifas podem apresentar-se desde eosinofílicas até marrom-acinzentadas. É comum o aparecimento de ambas as formas nos esfregaços cérvico-vaginais[1,2,9,10].

As bactérias que normalmente acompanham a CVV são os lactobacilos (Figura 6.15, *A*) e raramente *G. vaginalis*. Somente em 7 a 10% dos casos ela está associada à *Trichomonas vaginalis*[1,2,9,10]. As seguintes situações diagnósticas devem ser cuidadosamente avaliadas pelos citologistas:

- Entre 10% e 50% das mulheres em idade reprodutiva e assintomáticas podem apresentar *Candida* spp. vaginais. Mesmo nesses casos, deve ser relatada a presença de leveduras, ainda que em pequenas quantidades, uma vez que a colonização vaginal prévia predispõe à infecção.
- Na prática diária em citologia, quando são observadas apenas leveduras nos esfregaços, a tendência é relacionar apenas com colonização, porém somente a *C. albicans* é dimórfica e possui formas filamentosas como infectantes; as espécies não *albicans*, apenas a forma de leveduras, mesmo em infecção.

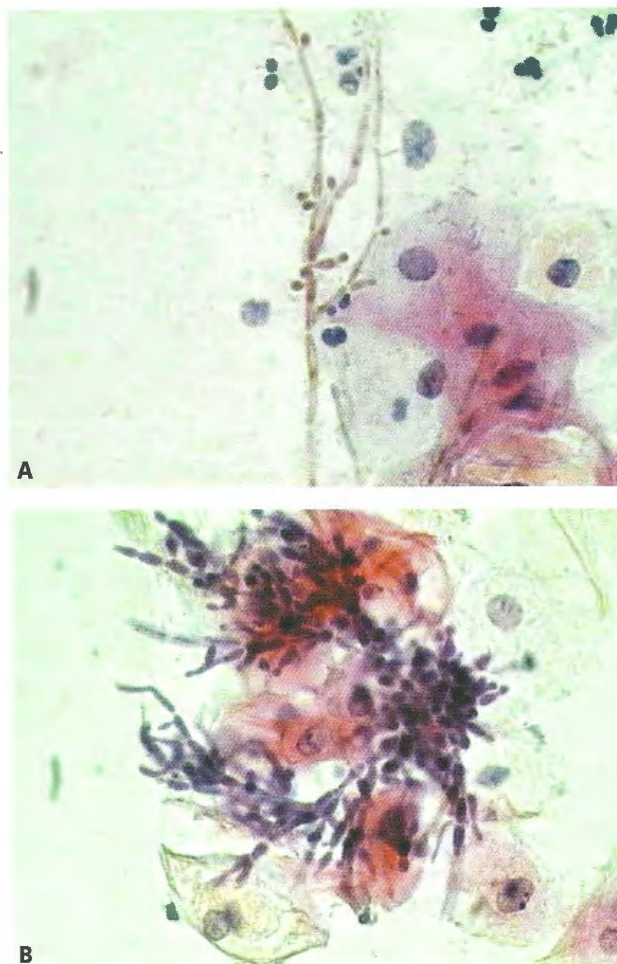



Figura 6.15 – *Candida* spp. (*A*) Formas de pseudo-hifas, com comprimentos variáveis, segmentadas como bambu, de cor rosada, e também de leveduras, com forma ovoide ou arredondada, também rosadas, às vezes rodeadas por halo esbranquiçado. Presença de microbiota lactobacilar. (*B*) Formas de pseudo-hifas relativamente pequenas, segmentadas, de cor roxa, e também de leveduras, com forma ovoide a alongada, também roxas. Esfregaços cérvico-vaginais corados por Papanicolaou (400×).

Assim, é importante relatar a forma fúngica observada no esfregaço e relacionar com a presença ou ausência de alterações celulares inflamatórias para definir quadro clínico de CVV ou colonização.

Vaginite e cervicite por *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis é um protozoário exclusivamente humano, sendo anaeróbio facultativo, flagelado, unicelular e provido de grande mobilidade. Pos-

sui apenas a forma trofozoítica, que é ovalada ou piriforme. O núcleo é excêntrico, também oval, localizado próximo aos flagelos. Não possui mitocôndrias, alimentando-se por fagocitose. Seu crescimento e movimentação são suprimidos no pH vaginal ácido normal e seu desenvolvimento ocorre em pH ideal de 5,5 a 6[16].

T. vaginalis é o agente causal da tricomoníase, infecção do sistema geniturinário de homens e mulheres que, segundo a OMS, é a DST não viral mais comum no mundo e infecção de possível transmissão sexual[28]. Estima-se que em torno de 200 milhões de pessoas, anualmente, sejam infectadas no mundo todo. Sua frequência na população feminina adulta é de 20 a 25%, mas varia significativamente em decorrência, principalmente, das condições socioeconômicas das populações estudadas, sendo associada a baixo nível socioeconômico. A prevalência da infecção aumenta com a idade, sendo mais prevalente após os 30 anos, fenômeno esse não observado em outras DST, como gonorreia ou infecção por *C. trachomatis*[29]. Essa é uma característica de infecções que podem ser assintomáticas e de longa duração, por isso se estendem a faixas etárias mais avançadas. Essa é uma diferença fundamental na epidemiologia desse patógeno, sendo condizente com o fato de a infecção por *Trichomonas* no trato geniturinário feminino passar de totalmente assintomática até uma vaginite grave e são admitidas às fases aguda, crônica e latente[29]. Cerca da metade de todas as pacientes infectadas é assintomática e um terço delas torna-se sintomática em 6 meses. Na infecção crônica, os sintomas são leves, com secreção vaginal escassa. Essa forma é particularmente importante do ponto de vista epidemiológico, pois esses indivíduos, mantendo-se sexualmente ativos, são a maior fonte de infecção do parasito[29,30].

Infecções por *T. vaginalis* estão associadas à ruptura prematura de membranas, ao parto prematuro, aos recém-natos de baixo peso, à pneumonia neonatal, à DIP e à linfadenopatia, além de facilitar a transmissão do HIV. Adicionalmente, esse parasito tem sido considerado um marcador de risco para outros agentes de DST, como *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis*[10,29,30].

A principal via de contaminação é por contato sexual, mas secreções, roupas íntimas, toalhas úmidas ou objetos contaminados, além de água de piscinas, também podem transmitir o parasito. O *T. vaginalis* pode sobreviver por mais de 48 h no exsudato vaginal a 10°C, por aproximadamente 3 h na urina recém-emitida, 6 h no sêmen ejaculado e 24 h em toalhas de pano umedecidas e a 35°C[16,29,30].

A maioria dos homens é assintomática, mas pode desenvolver uretrite pruriginosa. Nas mulheres, o local preferencial de alojamento do *T. vaginalis* é a vagina, mas pode também permanecer no canal cervical, na cavidade uterina, nas glândulas acessórias, na uretra e na bexiga. A patogenicidade envolve adesão do parasito preferencialmente nas células escamosas, destruindo-as por ação direta. Com a agressão do epitélio escamoso, ocorre aumento da vascularização local e desenvolvimento de reação inflamatória com intensidades variáveis. Quando sintomática, os principais sintomas são corrimento vaginal abundante, purulento, amarelo-acastanhado, amarelo-esverdeado ou esbranquiçado, fétido, bolhoso e pruriginoso, dispareunia e, eventualmente, disúria. Pode ocorrer também bartolinite. O exame ginecológico evidencia sinais de irritação vulvar, com hiperemia e edema nas paredes vaginais e do colo uterino, que pode apresentar aspecto característico de "morango", resultante do processo inflamatório com distensão dos vasos sanguíneos superficiais e focos hemorrágicos difusos[16,30].

O diagnóstico da infecção por *T. vaginalis* baseia-se comumente no exame de preparações a fresco de corrimentos vaginais e uretrais, secreção prostática e urina. Para tanto, recomenda-se que as amostras sejam examinadas microscopicamente dentro de, no máximo, 1 h após a coleta, para que sejam detectados parasitos ativamente móveis. As amostras biológicas jamais devem ser refrigeradas. A sensibilidade dessa técnica está entre 50% e 70% e depende, principalmente, do tempo entre a coleta e a realização do exame. Preparações microscópicas coradas com Papanicolaou e Giemsa também podem ser usadas. A coloração de gram não é recomendada, por não oferecer a diferenciação necessária en-

tre o parasito e as demais células presentes no esfregaço, principalmente leucócitos[16].

Cultura é o método mais sensível para a detecção de *T. vaginalis*. Entretanto, não é empregada de rotina, em virtude do custo dos meios de cultivo e da praticidade do método de pesquisa direta. A pesquisa também pode ser realizada com o uso de técnicas de detecção de ácidos nucleicos, empregando-se, por exemplo, sondas de DNA, para detecção direta do microrganismo na amostra biológica[16].

Em esfregaço citológico corado pelo Papanicolaou, é possível observar diversas alterações sugestivas da presença de *T. vaginalis*. Como o pH vaginal está aumentado, a microbiota bacteriana associada à infecção sintomática é caracterizada por redução de lactobacilos e aumento da microbiota anaeróbia, comumente do tipo mista ou cocoide (Figura 6.16). As alterações inflamatórias nas células epiteliais são intensas, com apagamentos de bordas citoplasmáticas, halos perinucleares (que são patognomônicos da infecção), anfofilia, pseudoeosinofilia, leucocitose, entre outras. O fundo de esfregaço é sujo e as células parabasais podem se descamar em razão da erosão promovida pelos parasitos. Os núcleos das células escamosas podem apresentar cromatina grosseira, hipercromasia, binucleação e cariomegalia. Essas alterações nucleares em células parabasais podem mimetizar lesão intraepitelial, que deve ser confirmada apenas após tratamento da infecção[1,2,9,10].

No esfregaço citológico, *T. vaginalis* aparecem ovais ou arredondados, com núcleo excêntrico, borrado e pouco definido, de aparência degenerada (Figura 6.16). A identificação do núcleo é necessária para diferenciar células metaplásicas degeneradas, núcleos desnudos, histiócitos ou polimorfonucleares. O tamanho, a morfologia, a coloração e a quantidade podem ser muito variados e os flagelos não são comumente observados. Os parasitos podem dispor-se em banquete ao redor das células escamosas. Nas fases assintomáticas ou levemente sintomáticas, as alterações celulares inflamatórias podem ser escassas ou não evidenciadas e os parasitos podem também ser escassos, dificultando o diagnóstico citológico[1,2,9,10].

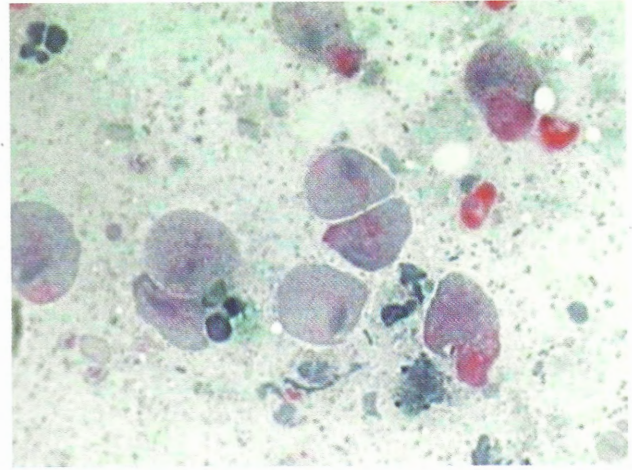



Figura 6.16 – *Trichomonas vaginalis*. Parasitos ovais ou arredondados, de cor rosada, com núcleo excêntrico, borrado e pouco definido, de aparência degenerada. Presença de microbiota mista. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

Outros parasitos, incluindo os intestinais, como *Enterobius vermicularis*, *Entamoeba histolytica*, *E. gingivalis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e agentes da cisticercose e filariose, além de artrópodes, podem eventualmente ser observados no esfregaço citológico[10], a maioria ocorrendo principalmente em decorrência de contaminação do trato gastrintestinal.

Herpes-vírus

Os herpes-vírus são DNA-vírus relativamente grandes (180 a 220 nm), com capsídio icosaédrico (162 capsômeros) e de envoltório lipídico. São capazes de formar inclusões intranucleares e infectar o homem, apresentando afinidade dermoneurotrópica. Podem causar infecções líticas, persistentes, latentes ou transformadoras. A família Herpesviridae engloba um grande número de vírus, sendo seis patogênicos ao homem (Quadro 6.2)[10,16].

Os herpes-vírus simples podem ser de dois tipos: HSV-1 e HSV-2. Ambos compartilham vários antígenos, mas possuem glicoproteínas específicas. O HSV-1 acomete, principalmente, lábios e face. Aproximadamente 90% da população apresenta anticorpos contra esse vírus, uma vez que pode ter sido infectada na infância sem apresentar sintomas. Já o HSV-2 acomete pre-

Quadro 6.2 – Herpes-vírus simples humanos patogênicos ao homem

- Herpes-vírus simples tipo 1 (HSV-1)
- Herpes-vírus simples tipo 2 (HSV-2)
- Citomegalovírus (CMV)
- Vírus da varicela-zoster (VZV)
- Vírus Epstein-Barr (EBV)
- Herpes-vírus humano 6 (HH6)

dominantemente a região genital, e a infecção ocorre, principalmente, no início da atividade sexual, entre 18 e 25 anos. Raramente o HSV-1 acomete os genitais; o HSV-2, a face e os lábios. As lesões permanecem infectantes por aproximadamente 10 a 12 dias[9,10].

O HSV-2 é transmitido por contato sexual, com parceiro infectado, ou raramente por contato orogenital, com portador de herpes labial em atividade. A contaminação por assentos ou toalhas contaminados é improvável, pois o vírus não consegue sobreviver fora do organismo. A inoculação direta pode ocorrer em profissionais de saúde, após exposição a secreções infectantes. A contaminação é grande na presença de lesões na fase de vesículas[10,16].

Há dois tipos de infecção celular pelo HSV. A infecção produtiva, na qual ocorre a replicação viral aguda em células epiteliais e fibroblastos, e a infecção latente, na qual o vírus migra e permanece nas terminações nervosas. O vírus penetra no corpo por infecção das mucosas ou soluções de continuidade da pele, causando infecção localizada, inaparente ou com produção de vesículas, que representa a fase produtiva e promove lise e morte celulares. O vírus dissemina-se para células adjacentes e para o neurônio responsável pela inervação, onde não se replica. Após situações específicas, como estresse, imunossupressão ou outras, retorna de forma retrógrada via neurônio para o local inicial de infecção, causando a infecção produtiva[1,2,10,16].

A replicação do vírus ocasiona lise da célula hospedeira, por inibir sua síntese macromolecular, degradar o DNA e provocar a ruptura do citoesqueleto, promovendo senescência celular. Diante disso, ocorrem alterações morfológicas, indicando morte celular. Várias cepas também iniciam a formação de sincícios. O HSV genital possui período de incubação de 1 a 26 dias (média de 7 dias), sendo a maioria das infecções iniciais assintomática. Quando há lesões cutaneomucosas, estas aparecem comumente entre 2 e 7 dias após a exposição. Em geral, as lesões são múltiplas, iniciando-se como pápulas ou vesículas pequenas que coalescem em lesões ulcerativas, as quais são dolorosas e podem ser acompanhadas de febre, mialgia e adenite inguinal. Após 10 a 15 dias, há o desenvolvimento de crosta seca e, posteriormente, resolução. As lesões tendem a ocorrer repetidamente na mesma área, e os intervalos entre as erupções variam entre os diferentes indivíduos. Os episódios de infecção recorrente são mais curtos e menos graves que os iniciais. Nos homens, acometem glande ou corpo do pênis; nas mulheres, vulva, vagina, cérvice uterina, períneo e face interna da coxa. Em crianças e lactentes, podem originar estomatite herpética e o recém-nascido pode adquirir a infecção no útero e, com maior frequência, durante a passagem pelo canal cervical, podendo ocorrer morte por acometimento disseminado das vísceras (fígado e pulmão) e também do SNC. Em médicos e enfermeiros, podem ocorrer lesões no local de contaminação, geralmente nos dedos (paroníquia herpética)[16].

O diagnóstico citológico é um dos mais utilizados. A coleta deve ser feita das bordas da lesão, e não do conteúdo das vesículas, que contém muito sangue e inflamação, comprometendo o diagnóstico. O HSV pode infectar células escamosas imaturas, metaplásicas e endocervicais. Os efeitos citopáticos mais observados são, inicialmente, citomegalia e cariomegalia, com deslocamento da cromatina para a periferia, dando um aspecto espesso à membrana nuclear. A seguir, as células sofrem os efeitos da replicação viral, com a detecção de células gigantes multinucleadas, provavelmente decorrentes da fusão das membranas citoplasmáticas das células infectadas, com núcleos de vários tamanhos e formas, amoldando-se uns aos outros. Perde-se o padrão cromatínico, passando a apresentar aspecto nebuloso, opaco, de "vidro fosco", que representa uma fase inicial da lesão. Em estágios

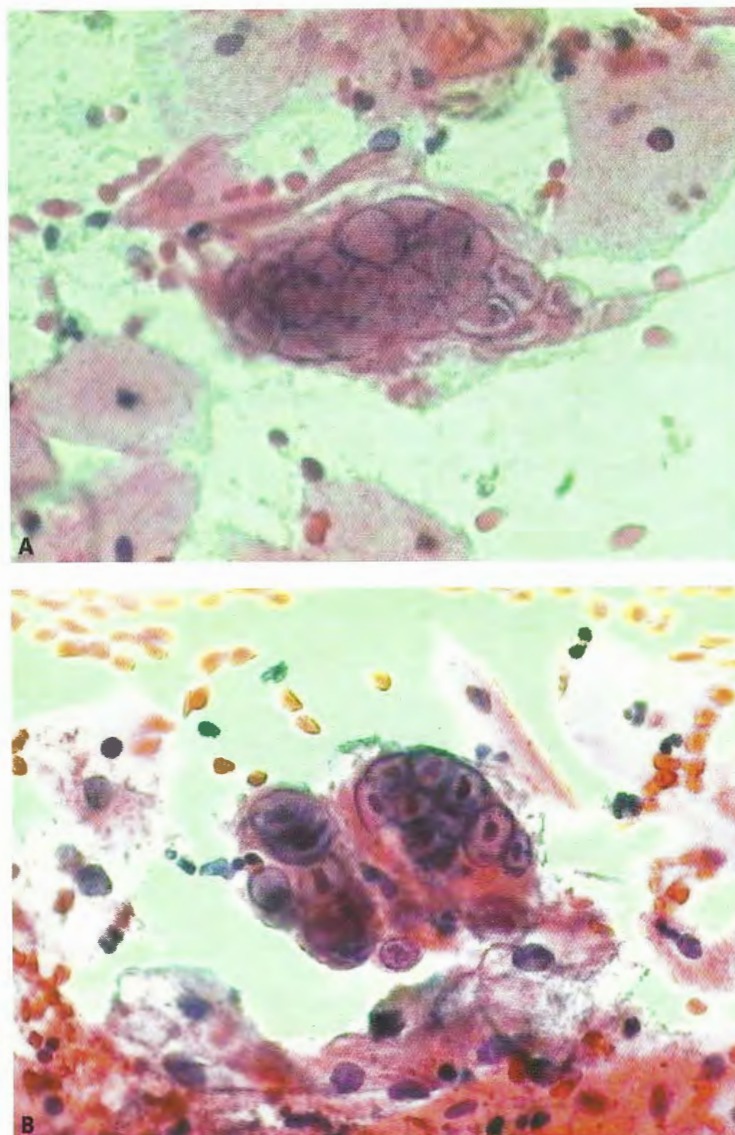



Figura 6.17 – HSV. (*A* e *B*) Células gigantes multinucleadas com núcleos de vários tamanhos e formas, amoldando-se uns aos outros. Padrão cromatínico com aspecto nebuloso, opaco, de "vidro fosco". Frequentes hemácias e células escamosas degeneradas. Inclusões intranucleares eosinofílicas redondas ou ovais, escassas em *A*, e frequentes em *B*. Esfregaço cérvico-vaginal corado por Papanicolaou (400×).

posteriores, são formadas inclusões intranucleares eosinofílicas redondas ou ovais, designadas como corpúsculos de inclusão intranuclear acidófilos tipo A de Cowdry[1,2,10,16] (Figura 6.17). As células com as alterações morfológicas descritas, características da infecção por HSV, são designadas como células de Tzank[16].

Citomegalovírus (CMV)

O CMV é um patógeno comum, infectando 0,5 a 1% de todos os recém-natos e aproximadamente 50% da população adulta. Suas principais formas de transmissão são as vias congênita, oral e sexual, transfusão sanguínea e transplantes. A porta de entrada mais comum é a região nasofaringeana, de onde os CMV vão para os linfonodos, infectando linfócitos e monócitos[16].

Mais que 50% da população feminina adulta demonstra anticorpos contra CMV, sendo a maioria das infecções no adulto assintomática. A infecção congênita é grave e ocorre via hematogênica ou através do canal do parto, podendo ocasionar abortos espontâneos, hepatoesplenomegalia, petéquias, microcefalia, coriorretinite e calcificações cerebrais (retardamento mental). Cerca de 10% dos recém-natos infectados apresentam quadro grave[16].

A infecção genital primária é incomum e, na maioria das vezes, assintomática. A identificação

em espécimes citológicos não é usual. A diferenciação citológica entre HSV e CMV pode ser extremamente difícil, uma vez que as alterações citológicas são muito semelhantes, podendo acontecer infecções concomitantes entre esses vírus. Observam-se, na citologia, células endocervicais multinucleadas e aumentadas, contendo inclusões intranucleares redondas, acidófilas e muito grandes. Mais comumente, ocorrem células com apenas um núcleo, com cromatina disposta em grumos, membrana nuclear espessa, inclusão nuclear acidófila única, desproporcionalmente grande em comparação com o tamanho total do núcleo, com amplo halo perinuclear[10,16]. Cultura e detecção de antígenos são muito mais sensíveis que a citologia[16].

Referências

1. SOLOMON, D.; NAYAR, R. **Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal**. 2. ed., Rio de Janeiro: Revinter, 2005. p. 21-32.
2. GOMPEL, C.; KOSS, L. G. **Citologia Ginecológica e suas Bases Anatomoclínicas**. São Paulo: Manole, 1997. p. 65-75.
3. MURTA, E. F. C.; SOUZA, M. A. H.; JÚNIOR, E. A. et al. Incidence of *Gardnerella vaginalis*, *Candida* sp and human Papillomavirus in cytological smears. **Rev. Paul. Med.**, v. 118, p. 105-108, 2000.
4. AVILÉS, A. G. P.; ZARAGOZA, C. O.; BARRERA, L. T. et al. Es útil la tinción de Papanicolaou como auxiliar del diagnostico de algunas infecciones de transmisión sexual? **Atenc. Prim.**, v. 27, p. 222-226, 2001.
5. CONSOLARO, M. E. L. Insights in cervical-vaginal cytology for detection of the vaginal microorganisms supplied by traditional tool. **Global Res. Net.**, Special Issue, p. 1-9, 2009.
6. DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. **Nature**, v. 449, p. 811-818, 2007.
7. ROSENSTEIN, I. J.; MORGAN, D. J.; SHEEHAN, M. et al. Bacterial vaginosis in pregnancy: distribution of bacterial species in different gram-stain categories of the vaginal flora. **J. Med. Microbiol.**, v. 45, p. 120-126, 1996.
8. BOSKEY, E. R.; CONE, R. A.; WHALEY, K. J. et al. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. **Hum. Reprod.**, v. 16, p. 1809-1813, 2001.
9. BONFIGLIO, T. A.; EROZAN, Y. S. **Gynecologic Cytopathology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997. p. 33-42.
10. BIBBO, M. **Comprehensive Cytopathology**. 2 ed., Philadelphia: Saunders, 1997. p. 125-143.
11. FREDERICKS, D. N.; FIEDLER, T. L.; THOMAS, K. K. et al. Target PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3270-3276, 2007.
12. LING, Z.; KONG, J.; LIU, F. et al. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. **BMC Gen.**, v. 11, p. 488, 2010.
13. FERRER, J. Vaginal candidosis: epidemiological and ethiological factors. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, v. 71, p. 21-27, 2000.
14. CIBLEY, L. J.; CIBLEY, J. L. Cytolytic vaginosis. **Am. J. Obst. Gyn.**, v. 165, p. 1245-1249, 1991.
15. WAITES, K. B.; TAYLOR-ROBINSON, D. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. In: MURRAY, P. R. **Manual of Clinical Microbiology**. 9 ed., Washington, DC: ASM Press, 2007. p. 1004-1020.
16. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 35-90, 246, 247, 262, 263, 365-388.
17. HIRAI, Y.; KANATANI, T.; ONO, M. et al. An indirect immunofluorescence method for detection of *Mycoplasma hominis* in vaginal smears. **Microbiol. Immunol.**, v. 35, p. 831-839, 1991.
18. MYER, L.; KUHN, L.; STEIN, Z. A. et al. Intravaginal practices, bacterial vaginosis, and women's susceptibility to HIV infection: epidemiological evidence and biological mechanisms. **Lancet Infect. Dis.**, v. 5, p. 786-794, 2005.
19. ELEUTÉRIO JÚNIOR, J.; CAVALCANTE, D. I. M. Contagem de morfotipos de *Mobiluncus* sp e concentração de leucócitos em esfregaços vaginais de pacientes com vaginose bacteriana. **Rev. Bras. Gin. Obst.**, v. 26, p. 221-227, 2004.
20. CATLIN, B. W. *Gardnerella vaginalis*: characteristics, clinical considerations, and controversies. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 5, p. 213-237, 1992.
21. ELHAG, K. M.; BAHAR, A. M.; MUBARAK, A. A. The effect of a copper intra-uterine contraceptive device on the microbial ecology of the female genital tract. **J. Med. Microbiol.**, v. 25, p. 245-251, 1988.
22. LAZAREV, V. N.; BORISENKO, G. G.; SHKARUPETA, M. M. et al. The role of intracellular glutathione in progression of the *Chlamydia trachomatis* infection. **Free Rad. Biol. Med.**, 2010, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.024.
23. VIGIL, P.; MORALES, P.; TAPIA, A. et al. *Chlamydia trachomatis* infection in male partners of infertile couples: incidence and sperm function. **Androl.**, v. 34, p. 155-161, 2002.
24. ZERVOMANOLAKIS, I.; OTT, W.; HADZIOMEROVIC, D. et al. Physiology of upward transport in the human female genital tract. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 1101, p. 1111-1120, 2007.
25. SMITH, J. R.; MURDOCH, J.; CARRINGTON, D. et al. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in women having cervical smear tests. **BMJ**, v. 302, p. 82-84, 1991.
26. SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, v. 369, p. 1961-1971, 2007.
27. FERRAZA, M. H. S. H.; MALUF, M. L. F.; CONSOLARO, M. E. L. et al. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Rev. Br. Ginecol. Obstet.**, v. 27, p. 58-63, 2005.
28. VERMITSKY, J. P.; SELF, M. J.; CHADWICK, S. G. et al. Survey of vaginal-flora *Candida* species isolates from women of different age groups by use of species-specific PCR detection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1501-1503, 2008.
29. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. **WHO**, Geneva, p. 27-29, 2001.
30. BOWDEN, F. J. Was the Papanicolaou smear responsible for the decline of Trichomonas vaginalis? **Sex. Transm. Infect.**, v. 79, p. 263, 2003.

Capítulo 7

Biologia do HPV

Tatiana Rabachini
Laura Sichero

INTRODUÇÃO

Os HPV são vírus de DNA pequenos, epiteliotrópicos, que estabelecem infecções produtivas no epitélio estratificado da pele, no trato anogenital e na cavidade oral. Até o momento, mais de 120 tipos diferentes de HPV já foram descritos, dos quais aproximadamente 40 infectam a região anogenital. Entre estes, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer da OMS classifica como carcinogênico em humanos os HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66[1]. Uma vez que mais de 99% dos tumores de colo de útero apresentam sequências de DNA viral, a infecção por HPV é considerada o principal agente etiológico dessa neoplasia[2]. A infecção por HPV de alto risco oncogênico também está associada ao desenvolvimento de tumores no pênis, na vulva e no ânus, além de papilomas nas regiões orofaríngea e esofaríngea.

Recentemente foram desenvolvidas vacinas profiláticas capazes de prevenir a infecção por HPV-16 e 18, que, juntos, são responsáveis por aproximadamente 70% dos tumores de colo de útero. A cada ano, aproximadamente 500.000 novos casos dessa neoplasia são diagnosticados no mundo todo; destes, em torno de um terço vai a óbito. No ano de 2008, foi concedido o Prêmio Nobel em Medicina ao Prof. Dr. Harald zur Hausen pela descoberta da associação entre a infecção por HPV e o desenvolvimento de câncer de colo de útero.

ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DE HPV

Os HPV são vírus pequenos, com um capsídio icosaédrico composto de 72 capsômeros pentaméricos, não envelopados, de aproximadamente 50 nm de diâmetro e que englobam uma molécula de DNA dupla-fita e circular, em torno de 8.000 pb, associada a proteínas semelhantes a histonas.

O genoma de HPV possui uma organização geral comum e bem conservada entre os diversos tipos virais. O genoma viral está dividido em três regiões: regulatória (LCR ou *long control region*), precoce (*Early* ou *E*) e tardia (*Late* ou L) (Figura 7.1).

A LCR localiza-se entre os genes *L1* e *E6* e compreende aproximadamente 10% do genoma viral. É nessa região que se ligam os fatores de transcrição celulares e virais que regulam a transcrição e a replicação do HPV (Figura 7.1).

As regiões precoce e tardia estão divididas em genes. Todos os genes são expressos a partir de um RNA mensageiro policistrônico transcrito de uma das fitas do DNA apenas. Sete ou oito genes estão na região precoce e dois, na tardia. Os produtos dos genes precoces, denominados *E1*, *E2*,..., *E8*, têm função no controle da replicação e da transcrição do DNA (*E1*, *E2*) e na transformação celular (*E5*, *E6* e *E7*). Os genes *L1* e *L2*, da região tardia, codificam as proteínas principal e secundária do capsídio, respectivamente[3].

TAXONOMIA E FILOGENIA DE HPV

Os HPV pertencem à família Papillomaviridae. Evidências iniciais da existência de diferentes genomas virais foram obtidas no início dos anos 1970, quando se observou que o RNA mensageiro, preparado a partir de verrugas plantares, hibridizava eficientemente com o DNA obtido de outras verrugas plantares, mas não com aqueles de outras origens, inclusive de regiões anogenitais. A heterogeneidade genética de HPV foi confirmada posteriormente, com base em diferenças no padrão de clivagem, utilizando-se diversas enzimas de restrição.

PV já foram detectados em aves e em quase todos os mamíferos, com exceção de camundongos de laboratório. Tradicionalmente, os isolados virais são categorizados como tipos de papilomavírus. Em humanos, mais de 120 tipos de HPV já foram descritos e completamente sequenciados. A maior parte destes está distribuída mundialmente, sendo observadas algumas diferenças na prevalência de tipos individuais através dos cinco continentes. Aproximadamente 40 tipos de HPV infectam a região anogenital, dos quais alguns estão associados exclusivamente às lesões benignas, como verrugas genitais comuns e condilomas, sendo, então, classificados como HPV de baixo risco oncogênico. Entre eles, os mais prevalentes são HPV-6 e 11. Por outro lado,

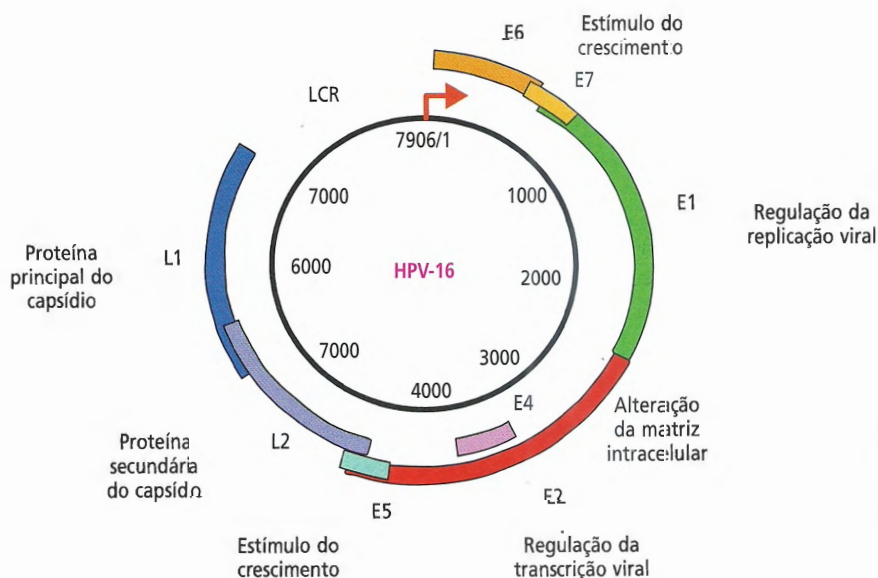



Figura 7.1 – Mapa físico do genoma de HPV-16. Regiões precoce (*Early*) e tardia (*Late*) e a LCR (*Long Control Region*), que corresponde à região regulatória.

HPV-16, 18, 31 e 33, entre outros, são denominados HPV de alto risco oncogênico, pois estão epidemiologicamente associados ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau e de carcinoma do colo do útero.

O Comitê de Nomenclatura de Papilomavírus baseia a taxonomia viral em sistemas filogenéticos que comparam o genoma viral completo ou fragmentos subgenômicos específicos. O gene tardio *L1* é o mais conservado, por isso é utilizado para a identificação de novos papilomavírus. O estudo da filogenia viral baseada na comparação de sequências nucleotídicas iniciou-se há aproximadamente duas décadas[4]. A árvore filogenética relativa à comparação de sequências do gene *L1* completo de 96 tipos de papilomavírus humano e de 22 papilomavírus animais é apresentada na Figura 7.2. É possível observar três níveis taxonômicos: gênero, espécie e tipo. Com algumas exceções, os agrupamentos filogenéticos coincidem com propriedades biológicas e patológicas.

Gêneros de papilomavírus compreendem os grandes ramos e apresentam menos de 60% de identidade nucleotídica na sequência completa

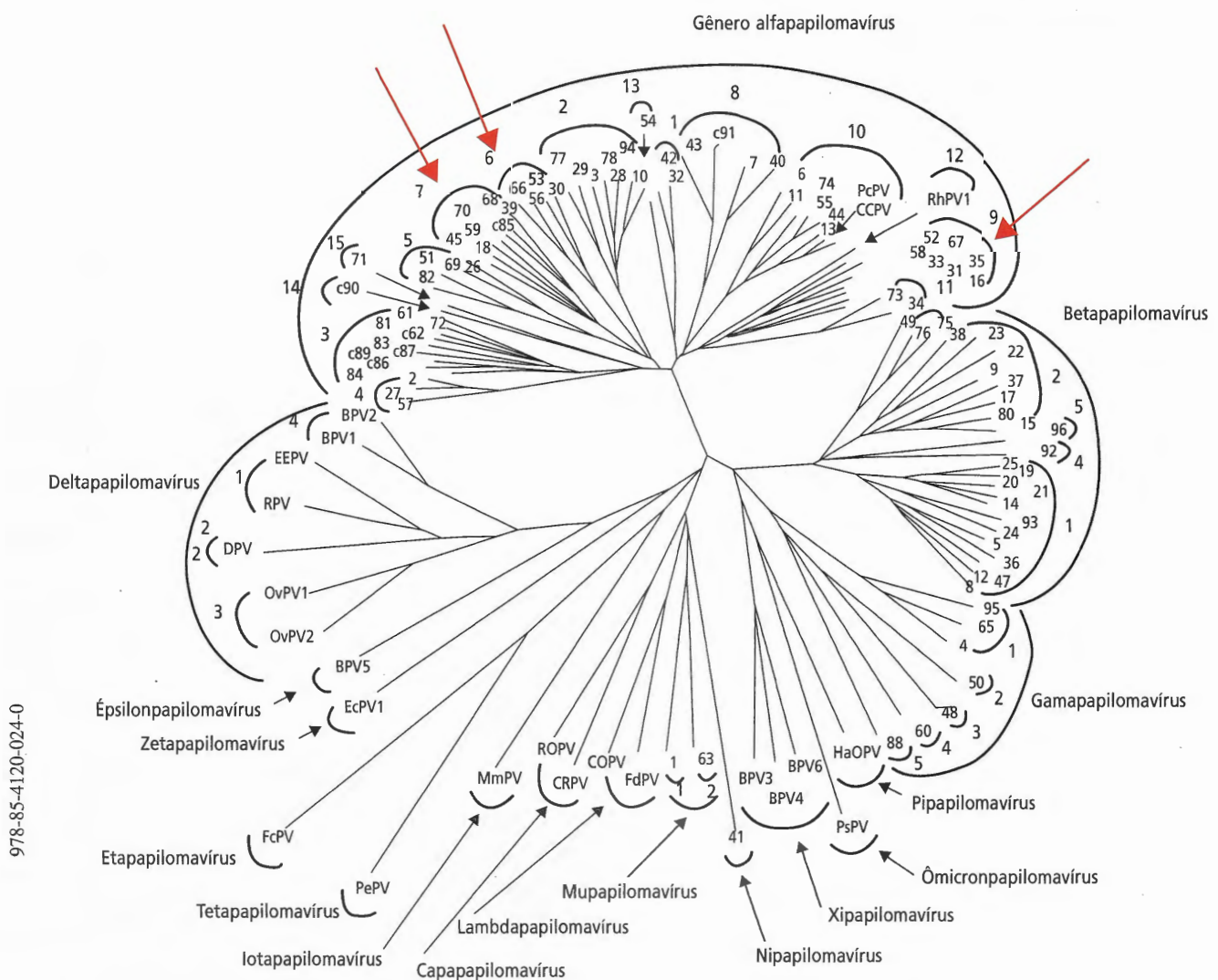



Figura 7.2 – Árvore filogenética contendo a sequência de 96 tipos de papilomavírus humano e de 22 papilomavírus animais. Os semicírculos maiores e menores correspondem aos gêneros e às espécies virais, respectivamente. Os gêneros são designados por letras do alfabeto grego. Os números entre os dois semicírculos indicam as espécies de papilomavírus. Os números no final de cada ramo correspondem aos tipos virais. As abreviações referem-se a tipos de papilomavírus que infectam animais. As *setas vermelhas* indicam as espécies que englobam os HPV de alto risco oncogênico (modificado de De Villiers *et al.* [5]).

978-85-4120-024-0

do gene *L1* (identidade entre 23% e 43%, comparando-se o genoma completo). Os gêneros são identificados por letras do alfabeto grego, seguidas da palavra papilomavírus. Os HPV relacionados com as lesões na região anogenital são designados alfapapilomavírus[5]. Esse gênero é formado por 15 espécies, das quais os HPV de alto risco oncogênico pertencem às espécies 6, 7 e 9. Os betapapilomavírus incluem todos os tipos de HPV associados à EV, doença cutânea com um componente genético. Com exceção dos alfa, beta e gamapapilomavírus, todos os outros gêneros são formados por papilomavírus que infectam outros mamíferos e aves. As espécies dos gêneros apresentam identidade entre 60% e 70% na sequência completa do gene *L1*. Ademais, os tipos virais apresentam entre 71% e 89% de identidade nessa região genômica. Acredita-se que os tipos virais componentes de uma mesma espécie possuam propriedades biológicas e médicas comuns. Diferenças na sequência de *L1* entre 2% e 10% caracterizam subtipos e menores que 2% são consideradas variantes de tipos de HPV. Existe maior divergência intratípica na região não codificante LCR, onde a dissimilaridade entre variantes pode atingir 5%.

Em relação a variantes moleculares de tipos de HPV, os estudos mais detalhados de variabilidade genética foram realizados para HPV-16, seguido de HPV-18 e 45, 6 e 11 e 5 e 8, em razão da alta prevalência desses tipos ao redor do mundo. Esses estudos mostraram que a variabilidade genética nos diferentes genes de HPV é filogeneticamente compatível, ou seja, mudanças nucleotídicas em um gene encontram correspondência com alterações nucleotídicas em outros genes. O padrão de dispersão viral, além da baixa taxa de evolução observada, sugere que os HPV coevoluíram com os seus hospedeiros naturais em um período de alguns milhões de anos. Estima-se que a diversidade observada entre HPV-16, 18 e provavelmente outros tipos represente mais de 200.000 anos de evolução a partir de um genoma precursor, provavelmente originário da África[6]. Algumas variantes são encontradas por todo o mundo, refletindo transferência populacional, e outras parecem estar associadas a determinados grupos étnicos, sugerindo evolução nessa localização. A colonização das Américas por europeus e africanos é refletida na composição das variantes de HPV nesse continente.

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE HPV

É controlada por fatores de transcrição virais e celulares que se ligam a sítios específicos da região regulatória. A sequência da LCR varia substancialmente em sua composição nucleotídica entre os diferentes tipos virais. Nos HPV de alto risco oncogênico, os transcritos são iniciados a partir de dois promotores virais principais, um dos quais inicia a transcrição a montante do gene E6, resultando na expressão das proteínas virais precoces. Em HPV-16, esse promotor é denominado P97 (ver Figura 7.1). A transcrição viral exibe grande especificidade celular, sendo a LCR ativa apenas em queratinócitos e células de carcinoma cervical. Embora, até hoje, não tenha sido descoberto qualquer fator de transcrição responsável por essa especificidade, acredita-se que a cooperação entre múltiplos fatores não específicos seja responsável por essa especificidade. Entretanto, até o momento não foram realizados experimentos conclusivos a fim de sustentar essa hipótese.

A regulação intragenômica da transcrição é mediada pela proteína viral E2. A LCR dos tipos de HPV que infectam a região anogenital contém quatro sítios de ligação a E2. A distância entre os quatro sítios de ligação é conservada. Fisicamente, a LCR está dividida em três segmentos funcionais distintos: o 5′ distal, o central e o 3′ terminal (Figura 7.3). A região 5′ distal contém o primeiro sítio de ligação a E2, além de sítios para terminação da transcrição e para poliadenilação do transcrito policistrônico. No segmento central da LCR, liga-se a maior parte dos fatores de transcrição celulares. Essa região intensificadora (*enhancer*) regula a transcrição dos genes precoces a partir do promotor localizado na extremidade 3′ terminal da LCR. Apenas algumas

978-85-4120-024-0

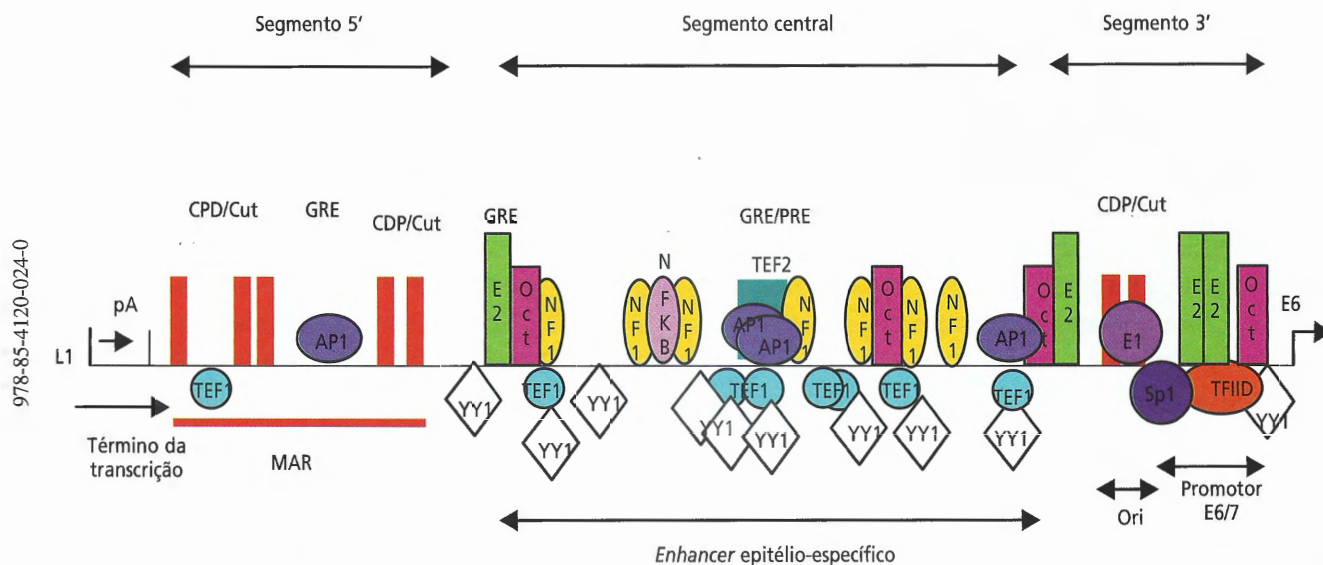



Figura 7.3 – Representação esquemática da LCR de HPV-16 mostrando os sítios de reconhecimento de fatores de transcrição virais e celulares.

sequências dessa região intensificadora e os fatores de transcrição que as controlam são parcialmente conservados entre os HPV que infectam a mucosa, sendo a localização dos sítios de ligação a E2 um exemplo.

Os três sítios próximos a TATA *box* estão envolvidos na repressão da transcrição viral. Na LCR de tipos de HPV que infectam a região anogenital, o terceiro sítio de ligação à proteína viral E2 sobrepõe-se parcialmente à sequência de reconhecimento da proteína celular SP1 e o quarto sítio à *TATA box*, competindo por ligação na LCR com o fator de transcrição celular TFIID. Dessa forma, E2 previne a formação do complexo de iniciação da transcrição por deslocar SP1 e TFIID, regulando, assim, os níveis de expressão das proteínas E6 e E7.

É importante observar que a atividade do promotor de HPV depende da estimulação por fatores de transcrição celulares que se ligam à região central da LCR. Muitos dos fatores de transcrição celulares que se ligam à LCR de HPV foram identificados. Um exemplo são os membros da família de fatores de transcrição AP1. Acredita-se que a ligação de AP1 seja responsável por uma das maiores contribuições na ativação do promotor precoce viral. Na LCR, também ocorrem agrupamentos de sítios de ligação da proteína celular NFI, e foi descrito seu papel na ativação do promotor precoce viral. Ainda mais, outros fatores foram descritos como capazes de ativar ou reprimir a expressão viral: OCT, TEF1, BRN3A, NFIL6, KRF1, YY1 (*keratinocyte-specific transcription factor*), EPOC1/SKN-1 e NFκB[7]. Na LCR de HPV-18 e 16, também foram mapeados GRE capazes de ativar a transcrição viral. A tecnologia de microarranjos permitiu, mais recentemente, a identificação de muitas outras proteínas que se ligam a LCR de HPV, diferentemente nas diversas camadas do epitélio estratificado.

A estrutura da cromatina também é importante na regulação da atividade do promotor de HPV. Os nucleossomos na LCR de HPV-16 e 18 ocorrem em posições precisas e reprimem a transcrição. Um desses nucleossomos sobrepõe-se à região intensificadora e outro, à origem de replicação do promotor de E6. Entre os dois nucleossomos, um sítio de ligação aos fatores de transcrição AP1 fica exposto. Durante a diferenciação do epitélio, ocorre aumento da atividade de AP1, que altera a estrutura do nucleossomo por conta da sua associação a histona acetilase, ativando dessa forma a transcrição viral. Esse mecanismo é, provavelmente, a principal ferramenta que acopla a transcrição e a replicação viral à diferenciação do epitélio.

FUNÇÃO DAS PROTEÍNAS VIRAIS

As proteínas E1 e E2 estão entre as primeiras proteínas virais a serem expressas após o estabelecimento da infecção. Ambas estão envolvidas no controle da replicação viral e são capazes de recrutar polimerases celulares e proteínas acessórias que se ligam à origem de replicação viral e dão início ao processo. A proteína E1 também possui atividade de helicase, permitindo a separação das fitas do DNA viral à medida que a replicação ocorre. A proteína E2, além de colaborar com E1 para o recrutamento da maquinaria de replicação celular, também é capaz de regular a transcrição dos genes virais precoces por se ligar a sítios específicos na LCR viral. Os sítios de ligação da proteína E2 na LCR são adjacentes aos sítios de ligação de fatores celulares que transativam a transcrição dos genes precoces. Em baixos níveis, E2 liga-se a esses sítios e ativa a transcrição dos genes adjacentes. Em altos níveis, contudo, essa proteína ocupa os sítios de ligação dos fatores de transcrição celulares, inibindo a transcrição dos genes da região precoce. Uma vez que os fatores de replicação E1 e E2 também são expressos como genes precoces, a habilidade de E2 de ativar ou reprimir a expressão contribui para o controle do número de cópias virais nas células não diferenciadas[8].

A proteína E4 é traduzida a partir de um transcrito alternativo conhecido como E1^E4. Esse transcrito apresenta parte da ORF do gene *E1*, e sua expressão parece estar intimamente ligada à diferenciação epitelial. Por ser capaz de se associar ao citoesqueleto de queratina, promovendo sua desestabilização, acredita-se que essa proteína esteja envolvida na maturação e na liberação das partículas virais para o meio extracelular[9].

A proteína E5 de HPV é uma proteína de membrana multifuncional localizada predominantemente no retículo endoplasmático. Ela é capaz de interagir com uma ATPase celular e prevenir a acidificação endossomal. Essa interação promove alteração na via de sinalização que controla a atividade do EGFR e também de outros receptores do tipo tirosinoquinase que modulam o crescimento celular. Apesar de ser a principal proteína transformante de BPV-1, a proteína E5 de HPV apresenta pouca atividade transformante em células humanas. De fato, a proteína E5 não parece ser necessária para a manutenção do fenótipo transformado, uma vez que o gene que a codifica encontra-se normalmente deletado em tumores da região anogenital. Sabe-se, contudo, que E5 é capaz de diminuir a expressão de moléculas de HLA de classe I, o que poderia contribuir para a evasão do vírus da resposta imune e o estabelecimento de uma infecção persistente[8].

A proteína E6 desempenha papel importante nos processos que podem levar uma célula infectada à transformação maligna. E6 é capaz de se ligar e induzir a degradação de inúmeras proteínas celulares, dentre as quais a proteína supressora de tumor p53. A proteína p53 desempenha um papel importante na manutenção da integridade do genoma e da homeostase celulares. Sua expressão normalmente é ativada em resposta a danos no DNA ou por estímulos mitogênicos inapropriados. Ela geralmente desencadeia a transcrição de genes envolvidos na parada do ciclo celular, apoptose e senescência. Para evitar a atividade pró-apoptótica de p53 e permitir a progressão do ciclo celular, E6 liga-se a E6-AP, uma ubiquitina ligase celular do tipo E3. A formação desse complexo resulta na ligação e na consequente ubiquitinação da proteína p53, levando à sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina. E6 também pode regular negativamente a atividade de p53, por se ligar ao seu coativador transcricional p300/CBP[10].

A proteína E6 também induz a degradação de várias proteínas que contenham o domínio PDZ, normalmente associadas ao controle da polaridade celular. Dentre os exemplos mais bem caracterizados, podem-se citar as proteínas MAGI1, 2 e 3, hDLG, hSCRIB e MUPP1, cuja interrupção da atividade pode contribuir para o estabelecimento do fenótipo maligno. A expressão de E6 também é capaz de induzir a imortalização de células epiteliais de mama. Um dos possíveis mecanismos envolvidos nesse processo está relacionado com a capacidade de E6 induzir a expressão de hTERT, a subunidade catalítica da telomerase, enzima composta de quatro subuni-

dades, responsável pela manutenção do comprimento dos telômeros. A atividade de telomerase é normalmente restrita às células germinativas e comumentemente não é observada em células somáticas. A perda da atividade de telomerase provoca o encurtamento dos telômeros a cada divisão celular e está relacionada com a indução de senescência. Na maioria das células tumorais, ocorre a reativação de hTERT, reconstituindo, dessa forma, a atividade da telomerase. A oncoproteína E6 é capaz de induzir a expressão de hTERT, aumentando sua transcrição mediante sua capacidade de modular a atividade do fator de transcrição c-MYC e seu cofator MAX. Por intermédio da análise da atividade de mutantes de E6 que são incapazes de induzir a degradação de p53, foi possível constatar que a capacidade de E6 de induzir a expressão de hTERT é mais importante para indução de imortalização que a própria degradação de p53[9].

Além das interações descritas anteriormente, a oncoproteína E6 dos HPV de alto risco oncogênico é capaz de interagir ou alterar a função de outras proteínas celulares, como paxilina, SRC, ERC55, E6-BP, E6-TP1 IRF3, BAK e TSC2[11].

Assim como a proteína E6, a E7 é capaz de interagir com inúmeras proteínas celulares. Uma das interações mais bem caracterizadas ocorre com a proteína supressora de tumor pRB e com os membros de sua família, p107 e p130. A proteína pRB controla a transição G1-S do ciclo celular mediante sua capacidade de regular a atividade dos fatores de transcrição da família E2F. Os membros dessa família de proteínas podem ativar ou reprimir a transcrição de inúmeros genes relacionados com progressão do ciclo celular, diferenciação, mitose e apoptose. Em células normais, a proteína pRb impede a transcrição de genes regulados por E2F, por se ligar diretamente ao domínio de transativação dessa proteína. No final da fase G1, a proteína pRB é fosforilada por complexos de CDK que promovem a dissociação de pRB e E2F. Uma vez livre, a proteína E2F é capaz de ativar a transcrição de genes necessários na fase S do ciclo celular. Em células infectadas, E7 liga-se à forma hipofosforilada da proteína pRB e promove a liberação precoce do fator de transcrição E2F. Como consequência, genes responsivos à ativação de E2F, como os que codificam as ciclinas A e E, passam a ser transcritos, promovendo a entrada prematura na fase S do ciclo celular e a síntese de DNA. E7 também afeta a expressão de genes da fase S por interagir diretamente com alguns membros da família E2F e com HDAC. Mediante a formação de um complexo com RB e HDAC, E7 promove um atraso na diferenciação das células infectadas. Isso facilita a replicação e a manutenção dos epissomos, já que a síntese de DNA não é interrompida nas células das camadas suprabasais. Além de se ligar à pRB, a E7 também é capaz de induzir a sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina. Essa degradação faz que E7 não só seja capaz de prevenir a associação de pRB, p107 ou p130 com membros da família E2F, mas também de interromper qualquer outra atividade de pRB. Isso inclui a capacidade de reparo a danos no DNA e a manutenção da integridade genômica[10].

Além de inativar pRB, a proteína E7 também contribui para o processo de imortalização, por interagir com proteínas essenciais ao controle de progressão do ciclo celular. Os inibidores de CDK p21 e p27 são reguladores importantes que induzem a parada de proliferação durante o processo de diferenciação epitelial. Um dos principais alvos de p21 e p27 em queratinócitos humanos é a proteína CDK2, que controla a transição G1-S e a progressão do ciclo celular mediante sua interação com as ciclinas E e A, respectivamente. Para manter a atividade de CDK2 elevada, a proteína E7 dos HPV de alto risco liga-se eficientemente a p21 e p27, neutralizando seu efeito inibitório sobre os complexos ciclinas E/CDK2, ciclina A/CDK2. A proteína E7 dos HPV de alto risco também é capaz de aumentar os níveis da fosfatase CDC25A, capaz de ativar CDK2 por desfosforilar resíduos de tirosina dessa proteína[8].

Além das interações descritas anteriormente, a oncoproteína E7 dos HPV de alto risco oncogênico é capaz de interagir ou alterar a função de outras proteínas celulares, como PML, IGFBP3, PP2A, AKT, eIF4E, 4EBP1, PCNA e p53[11].

Tabela 7.1 – Função das proteínas de HPV

Proteína viral	Função
E1	Controle da replicação viral Recrutamento de polimerases e proteínas acessórias Atividade de helicase
E2	Auxilia o processo de replicação viral Regulação da transcrição dos genes precoces Recrutamento de polimerases e proteínas acessórias
E4	Desestabilização do citoesqueleto de queratina Maturação e liberação das partículas virais
E5	Previne a acidificação endossomal Liga-se a receptores de fatores de crescimento Diminui a expressão de moléculas de HLA de classe I
E6	Altera a atividade de proteínas que controlam proliferação, apoptose, adesão e crescimento celular Induz a degradação de p53 e de outras proteínas
E7	Altera a atividade de proteínas que controlam proliferação, apoptose, adesão e crescimento celular Induz a degradação de pRb e de outras proteínas
L1	Principal componente do capsídio viral
L2	Proteína secundária do capsídio viral

As proteínas que compõem o capsídio viral, L1 e L2, são expressas tardiamente no ciclo de vida viral, nas camadas mais diferenciadas do epitélio. A proteína L1 é a principal constituinte do capsídio do papilomavírus e a proteína viral mais abundante, constituindo cerca de 80% do total das proteínas virais. Essa proteína parece abrigar epítopos tipo-específicos e ser altamente imunogênica. A proteína L2, por sua vez, é a proteína viral menos abundante. Embora seja um componente estrutural adicional do capsídio viral, associada a L1, parece ter um papel importante na incorporação do DNA viral dentro do vírion[8]. Mediante a expressão dessas duas proteínas em sistemas heterólogos, é possível a obtenção de partículas virais vazias, denominadas VLP. Atualmente as VLP são a base das vacinas que previnem infecções tanto por HPV de alto risco (16 e 18) quanto por HPV de baixo risco (6 e 11)[12,13].

A Tabela 7.1 resume as funções das proteínas dos papilomavírus humanos.

CICLO DE VIDA VIRAL

O ciclo de vida do HPV é intimamente ligado à diferenciação epitelial. No epitélio escamoso, o crescimento ocorre em camadas estratificadas, onde apenas as células da camada basal são capazes de se dividir ativamente. Após deixar a camada basal, as células-filhas geradas param de se dividir e começam a se diferenciar, produ-

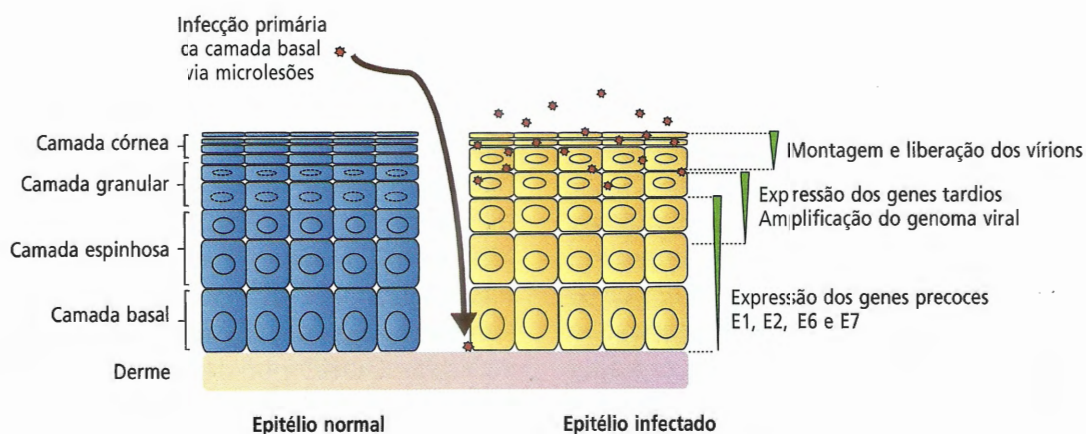



Figura 7.4 – O ciclo viral do papilomavírus humano em um epitélio estratificado escamoso. O epitélio não infectado (*esquema à esquerda*) é comparado ao epitélio infectado (*esquema à direita*). Através de microlesões, o HPV é capaz de infectar células da camada basal do epitélio. À medida que ocorre a diferenciação, os genes virais são ativados, o DNA do vírus é replicado e as proteínas do capsômero são sintetizadas. As partículas virais formadas são liberadas na superfície da mucosa, onde podem infectar outras células (modificado de Moody e Laimins[10]).

zindo tipos específicos de queratina. Enquanto a diferenciação progride, a queratina acumula-se na célula e o envelope nuclear fragmenta-se. Nas camadas mais diferenciadas do epitélio, as células não possuem atividade metabólica e apresentam-se apenas como pacotes de queratina[8].

Durante a infecção pelo HPV, as proteínas virais fazem que as células não parem de se dividir em resposta ao início do processo de diferenciação. Isso é necessário para que a progênie viral seja produzida. Para que a infecção pelo HPV persista, é necessário que o vírion infecte a camada basal do epitélio, o que ocorre normalmente mediante microlesões. Uma vez no núcleo, o genoma viral permanece na forma epissomal e o promotor dos genes precoces é ativado. Nas células infectadas, o DNA viral replica-se e é possível encontrar 50 a 100 cópias de DNA epissomal por célula. Quando ocorre a divisão celular, o genoma viral é dividido entre as células-filhas, que, ao migrarem para as camadas superiores do epitélio durante o processo de diferenciação, continuam com o ciclo celular ativo. À medida que as células infectadas diferenciam, o promotor que ativa a transcrição dos genes tardios é ativado. Isso indica o início da fase produtiva do ciclo de vida do HPV, marcada principalmente pelo aumento da amplificação do genoma do vírus. Nas camadas mais diferenciadas do epitélio, o DNA viral é empacotado em novos capsídios e a progênie do vírus é liberada da célula à medida que o epitélio descama (Figura 7.4)[10].

TUMORIGÊNESE OU POTENCIAL ONCOGÊNICO

A falha do sistema imunológico em eliminar uma infecção persistente pode induzir a transformação maligna do epitélio infectado. Contudo, essa transformação pode levar décadas. Em lesões pré-cancerosas, a maioria dos genomas virais persiste em forma epissomal. Por outro lado, em lesões de alto grau, o genoma do HPV está frequentemente integrado ao genoma do hospedeiro. Mais da metade dos tumores do colo uterino, positivos para HPV-16, apresenta o genoma do vírus integrado. No caso dos tumores positivos para HPV-18, a taxa de integração é ainda mais elevada. Acredita-se que a integração favoreça a transformação maligna. Em lesões de alto grau e carcinomas do colo uterino, o tipo de integração mais frequentemente observado é aquele que interrompe o gene *E2*. Em lesões que contenham o genoma do HPV na forma epissomal, a proteína E2 reprime diretamente a expressão dos genes precoces. Isso faz parte de um mecanismo de controle que regula o número de cópias virais. Quando a integração interrompe o gene *E2*, a regulação da expressão dos genes precoces é perdida. Isso quer dizer que E6 e E7 passam a ser expressos de maneira constitutiva[3]. Esse evento está relacionado com o aumento da capacidade proliferativa, passo crucial para o desenvolvimento de uma neoplasia. O RNA mensageiro de E6 e E7, expresso a partir de cópias integradas, também apresenta maior estabilidade. Isso confere às células com genoma integrado maior vantagem seletiva quando comparadas com células que contêm apenas o genoma na forma epissomal. A reintrodução de E2 em células cancerosas que contenham apenas cópias integradas do genoma viral induz o processo de senescência celular, indicando que a expressão de E6 e E7 é necessária para a manutenção do fenótipo transformado. Estudos recentes também sugerem que um importante passo para a indução de carcinogênese seja a coexistência de formas epissomais com formas integradas de HPV. A expressão de E1 e E2 a partir de epissomos pode iniciar a replicação do DNA integrado a partir das suas origens de replicação. Isso favorece a instabilidade genética e a indução de anormalidades cromossômicas. A replicação de cópias integradas também favorece a ativação dos mecanismos de reparo e recombinação, o que poderia favorecer o aumento de mutações celulares, alterações genômicas e, eventualmente, a progressão para um fenótipo maligno[10].

A capacidade dos HPV de alto risco de transformar células é claramente associada à atividade das oncoproteínas E6 e E7. A expressão isolada

de E7 pode induzir a imortalização de queratinócitos de maneira pouco eficiente. Por outro lado, a expressão isolada de E6 não é capaz de induzir a imortalização de queratinócitos primários. Contudo, quando expressas em conjunto, essas proteínas são capazes de imortalizar a grande maioria de células primárias. A expressão de E6 e E7 em culturas organotípicas de queratinócitos, um tipo de cultura de tecidos que simula a diferenciação e a estratificação epitelial, resulta em alterações celulares idênticas àquelas observadas em lesões intraepiteliais de alto grau. Isso demonstra a importância dessas proteínas na carcinogênese induzida por HPV[8]. Além disso, camundongos transgênicos que expressam E6 e E7 nas camadas basais de seu epitélio desenvolvem carcinomas escamosos quando são submetidos ao tratamento com baixas doses de estrógeno. Nesses animais, a expressão isolada de E7 é suficiente para induzir displasias de alto grau e carcinomas invasivos na região da cérvice uterina. A adição de E6 provoca aumento no tamanho dos tumores e na área acometida, indicando mais uma vez o papel cooperativo dessas proteínas na carcinogênese do colo uterino[10].

Embora a combinação de E6 e E7 possa imortalizar células em cultura de maneira eficiente, sua expressão concomitante não faz que essas células sejam capazes de gerar tumores em camundongos imunocomprometidos. Mesmo em cultura, a transformação maligna exige inúmeras passagens ou a expressão de outros oncogenes, como *v-RAS* ou *v-FOS*. Isso é especialmente relevante para entender porque a maioria das pessoas infectadas por tipos oncogênicos de HPV não desenvolve neoplasias anogenitais. Apesar de ser necessária, a expressão de E6 e E7 não é suficiente para a indução do fenótipo maligno[10].

Referências

1. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Epstein-Barr virus and Kaposi sarcoma herpesvirus/human herpesvirus 8. Lyon, France, **International Agency for Research on Cancer**, 1997.
2. WALBOOMERS, J. M. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J. Pathol.**, v. 189, p. 12-19, 1999.
3. ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 342-350, 2002.
4. CHAN, W. K.; DELLIUS, H.; HALPERN, A. L. et al. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny and taxonomy. **J. Virol.**, v. 69, p. 3074-3083, 1995.
5. DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R. et al. Classification of papillomaviruses. **Virol.**, v. 324, p. 17-27, 2004.
6. HO, L.; CHAN, S. Y.; BURK, R. D. et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a mean of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. **J. Virol.**, v. 67, p. 6413-6423, 1993.
7. O'CONNOR, M.; CHAN, S. Y.; BERNARD, H. U. Transcription factor binding sites in the LCR of genital HPVs. In: MYERS, G. et al. **Human Papillomaviruses. A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Aminoacid Sequences.** Los Alamos National Laboratory, p. III 21-41, 1995.
8. CHOW, L. T.; BROKER, T. R.; STEINBERG, B. M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **APIMS**, v. 118, p. 422-449, 2010.
9. HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev. Med. Virol.**, v. 16, n. 2, p. 83-97, 2006.
10. MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat. Rev. Cancer**. v. 8, p. 550-560, 2010.
11. PIM, D.; BANKS, L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. **APIMS**, v. 118, p. 471-493, 2010.
12. KOUTSKY, L. A.; AULT, K. A.; WHEELER, C. M. et al. Proof of principle study investigators. a controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, p. 1645-1651, 2002.
13. VILLA, L. L.; COSTA, R. L.; PETTA, C. A. et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. **Br. J. Cancer**, v. 95, p. 1459-1466, 2006.

Capítulo 8

Imunologia Cérvico-Vaginal e Respostas ao Papilomavírus Humano

Ana Paula Lepique

INTRODUÇÃO

O sistema imunológico compreende mecanismos de defesa celulares e humorais do organismo. Classicamente, as respostas imunológicas são divididas em inata e adaptativa. A inata compreende células e moléculas prontamente ativadas por patógenos, em respostas rápidas e de especificidade relativamente baixa; a adaptativa, células que precisam ser ativadas por elementos da resposta inata, sendo uma resposta mais lenta do que a inata, mas extremamente específica. Além disso, a resposta adaptativa pode gerar memória, onde uma segunda exposição ao patógeno dispara mecanismos efetores de forma mais rápida e mais potente do que a exposição inicial. Os principais elementos da resposta inata são epitélio, moléculas com atividade antibiótica, como defensinas e catelicidinas, células como neutrófilos, macrófagos e células NK, proteínas circulantes, como proteínas do sistema complemento, colectinas, pentraxinas e, ainda, citocinas que medeiam diversas respostas celulares e controlam inflamação, como IL-1 (IL-1α, IL-1β), TNF, interferonas tipo I e IL-10 e IL-12. Já a resposta adaptativa compreende os linfócitos T e B e seus produtos. Os linfócitos B produzem anticorpos com diversas atividades biológicas; os linfócitos T, citocinas que influenciam a resposta adaptativa, auxiliando ou ativando outras células do sistema imune, ou apresentam atividade citotóxica, agindo diretamente contra células do hospedeiro infectadas ou, ainda, células tumorais (Figura 8.1).

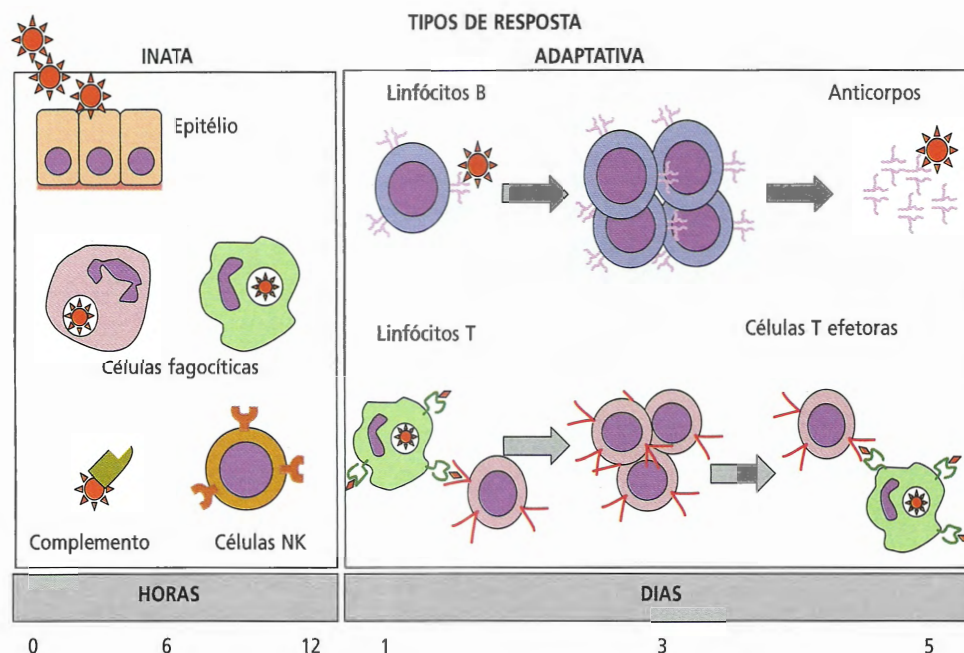



Figura 8.1 – Elementos e cinética de ativação das respostas inata e adaptativa. A resposta inata é rápida e composta de elementos que estão prontos para resposta, sendo esses os epitélios, as células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos, as células NK e as proteínas solúveis, por exemplo, o sistema complemento. A resposta adaptativa é lenta, necessitando de vários dias para ativação. Esse sistema é composto dos linfócitos T e B, que, após ativação, passam por um processo de expansão dependente da ligação pelo antígeno. Os linfócitos B produzem anticorpos, enquanto os linfócitos T apresentam mecanismos efetores diretos, no caso das células CD8, ou indiretos, mediante, por exemplo, a secreção de citocinas que ativam outros mecanismos efetores. A maior parte dos linfócitos ativados por um determinado tipo de antígeno morre, porém alguns formam resposta chamada de memória. Os linfócitos de memória podem sobreviver muito tempo no organismo e sofrer nova expansão caso sejam novamente ativados pelo mesmo antígeno (adaptado de Abul, K. *et al.*[1]).

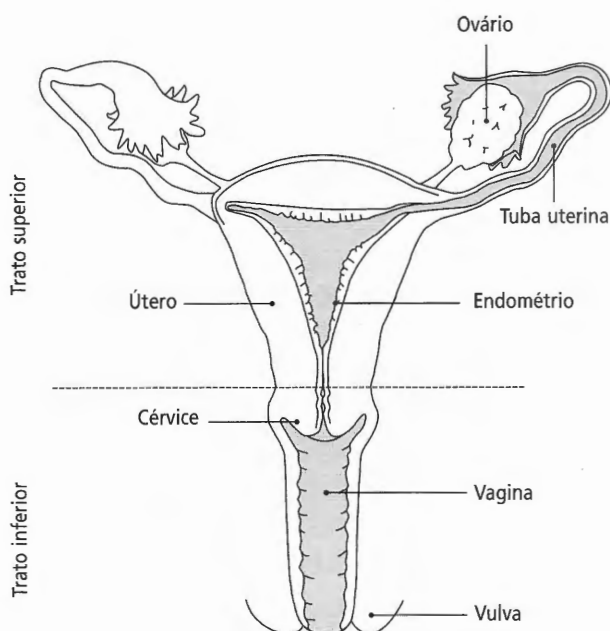



Figura 8.2 – Representação esquemática do aparelho genital feminino com indicação das principais estruturas e dos compartimentos inferior e posterior.

Dos elementos aqui descritos, praticamente todos têm papel na defesa dos tecidos do aparelho reprodutor feminino.

O trato genital feminino é normalmente dividido em duas partes: a superior, formada pelos ovários, pelas trombas uterinas e pelo útero; e a inferior, composta da vulva, da vagina e do colo ou da cérvice uterina (Figura 8.2). Além das diferenças funcionais e morfológicas entre esses diferentes tecidos que formam o trato genital feminino, os compartimentos superior e inferior diferem quanto à exposição a agentes infecciosos. O trato genital inferior é mais exposto a agentes infecciosos provenientes de diversas fontes, sendo uma das principais o contato sexual. Por outro lado, o útero aloja o feto, que é geneticamente diferente do organismo da mãe, o que exige um controle imunológico muito diferente de outros tecidos do organismo (ver detalhes nos Capítulos 1, 2 e 6).

Este capítulo trata das respostas imunológicas observadas no trato genital feminino inferior a diversos tipos de patógenos, principalmente o HPV.

O trato genital inferior é coberto por epitélio escamoso estratificado até a cérvice, onde há uma transição para epitélio simples. Os epitélios são parte da resposta inata de um organismo. Desse modo, a discussão deste Capítulo será iniciada por essas estruturas. Utilizar-se-á a clássica divisão entre resposta inata e adaptativa, mas os leitores devem ter em mente que esses dois tipos de respostas são interdependentes e que a resposta adaptativa utiliza elementos da resposta inata como mecanismo efetor.

ELEMENTOS DE DEFESA PRESENTES NOS EPITÉLIOS DO TRATO GENITAL FEMININO INFERIOR

Uma das características dos epitélios é a forte interação entre as células, o que forma uma barreira física importante para a integridade do organismo e proteção contra a entrada de patógenos. As células epiteliais ligam-se umas às outras por proteínas ligadas ao citoesqueleto, como as zônulas de oclusão, que formam uma estrutura semelhante a um zíper entre as células, impedindo a passagem de qualquer patógeno por entre as células, ou ainda por proteínas como as caderinas, que fazem interações homotípicas entre duas células, de forma dependente de cátions (Figura 8.3).

As células epiteliais, assim como outras células do sistema inato, expressam receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos. Os mais bem descritos, expressos no epitélio cervical, são os TLR. Essa é uma família de receptores transmembranares, localizados na membrana plasmática ou na de endossomos, que reconhecem moléculas típicas de patógenos, mas que não estão presentes no organismo. Por exemplo, TLR4 reconhece lipopolissacarídeos de parede de bactérias; TLR3, RNA dupla-fita presente no ciclo de vida de alguns vírus e TLR9, dinucleotídeos CG não metilados, comuns em vírus e bactérias. Com isso, esses receptores acusam a presença de patógenos no nosso organismo. Esses receptores ativam vias de sinalização na célula, no caso na célula epitelial, levando ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e da expressão da maquinaria de apresentação de antígenos, tornando a célula um alvo

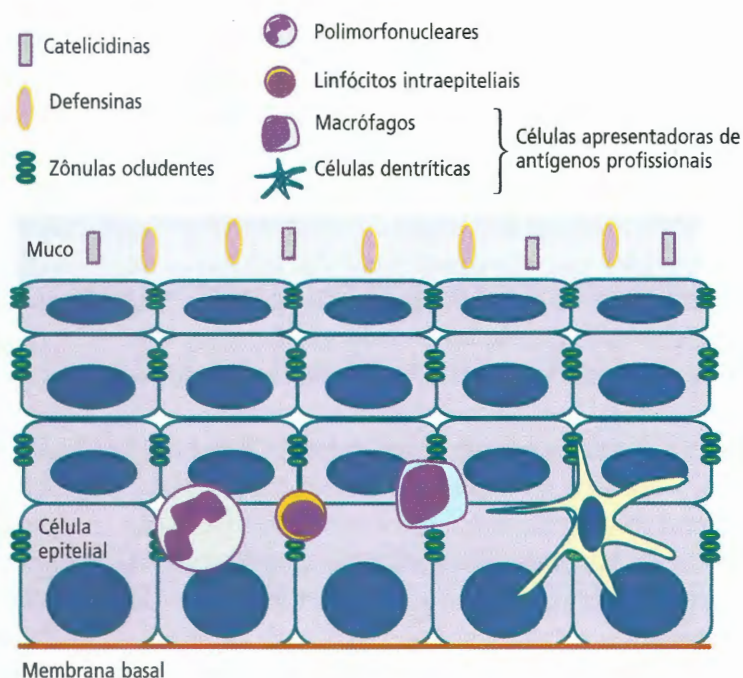



Figura 8.3 – Representação do epitélio como barreira física e elementos de defesa e vigilância imunológica presentes na mucosa cérvico-vaginal. A representação da transição para o epitélio simples do colo uterino não está indicada nesta figura.

978-85-4120-024-0

para o sistema imune adaptativo. Em células infectadas com HPV-16, observa-se que a expressão de TLR9 é reduzida. Isso decorre da inibição direta da transcrição do gene que codifica TLR9 pelas oncoproteínas E6 e E7 de HPV[2,3]. Essa inibição pode ser um mecanismo de evasão importante, uma vez que o genoma de HPV contém diversos sítios que podem ativar os receptores TLR9.

Além da barreira física, os epitélios produzem ou acumulam substâncias que apresentam atividade microbiótica, ou ainda enzimática, por exemplo, ribonucleo-proteases. Uma das substâncias observadas nos epitélios são as defensinas, peptídeos com menos de 100 aminoácidos, com carga positiva por conta do grande número de resíduos de arginina. As defensinas são produzidas por diversos tipos celulares, incluindo fagócitos e células epiteliais. As defensinas α e β, que representam as duas principais famílias de defensinas, são vistas na mucosa vaginal. Estudos recentes demonstraram que a infecção bacteriana provoca o aumento da concentração da família α na mucosa vaginal, em paralelo com o aumento do número de células do infiltrado inflamatório, composto, nesse caso, de neutrófilos. As defensinas apresentam, principalmente, ação antibacteriana, embora vírus envelopados também possam ser inativados por defensinas. A atividade citotóxica de defensinas contra bactérias envolve danos à membrana, à inibição de síntese de RNA e proteínas e redução da viabilidade celular. Nos vírus envelopados, é possível que as defensinas funcionem como moléculas neutralizantes, já que algumas delas apresentam alta avidez por glicoproteínas. As bactérias da espécie *Neisseria gonorrhoeae* são naturalmente resistentes às defensinas, em razão da expressão e da atividade de um sistema de efluxo dependente de energia, *mtr*, que também promove resistência a outro peptídeo antimicrobiano LL37 (ver a seguir). As defensinas da subfamília θ, ou retrociclinas, também são observadas no epitélio cérvico-vaginal e têm papel importante no controle das infecções por HIV. Elementos do sistema imune variam, dependendo do ciclo hormonal feminino. A concentração de defensinas α e β chegam a variar até 50 vezes, dependendo do ciclo menstrual.

Outro tipo de proteína com atividade microbicida observado nos epitélios é a catelicidina. As catelicidinas são uma família de genes que codificam proteínas precursoras que possuem uma sequência N-terminal conservada (domínio Catelina) e um domínio C-terminal catiônico com atividade microbicida. Para que o domínio C-terminal seja ativado, é necessário que ele seja clivado da molécula precursora. O exemplo mais comum é o LL37. As catelicidinas são expressas por neutrófilos, células NK, linfócitos T e B, monócitos, mastócitos e outras linhagens hematopoiéticas. Observa-se o acúmulo delas na saliva, nas lágrimas, no líquido seminal, no muco das vias aéreas e em tecidos como pele, epitélio das vias aéreas, boca, língua, esôfago, intestino, cérvice uterina e vagina[4,5,6,7].

O sistema complemento consiste em um conjunto de proteínas solúveis que funcionam como uma cascata de proteases, onde subunidades ficam ligadas ao patógeno ou à célula-alvo, formando uma estrutura que pode culminar na formação de poros que levam ao extravasamento do conteúdo celular e ao choque osmótico, provocando lise celular. A ativação da cascata de complemento pode ocorrer por três vias diferentes, todas convergindo para a proteína C3. A via conhecida como clássica é ativada por moléculas de anticorpos ligadas ao alvo específico. A via alternativa é ativada espontaneamente, de forma muito lenta, e inibida muito rapidamente, a não ser que a proteína C3 ativada ligue-se a um patógeno. A via das lectinas é ativada pela ligação de MBL a resíduos de manose, comuns em diversos patógenos como fungos e bactérias. Durante o processo de ativação, C3 é clivada, formando duas subunidades: C3a e C3b. A C3a tem função quimiotática, recrutando células inflamatórias para o sítio de infecção; C3b promove opsonização do patógeno, podendo iniciar, também, a cascata que leva à formação do complexo MAC, que consiste em um canal formado por outras proteínas do sistema complemento que perfuram a membrana celular, ocasionando a perda de conteúdo citoplasmático e a morte celular[8,9].

Em mulheres com candidíase vulvovaginal, observou-se que a expressão da MBL aumenta durante a infecção. Algumas mulheres, porém, apresentam candidíase vulvovaginal recorrente. Nestas, demonstrou-se que a expressão de MBL é muito baixa, o que é dependente de polimorfismo no códon 54[10].

Além do efeito contra patógenos, o sistema complemento pode eliminar células tumorais. De fato, observou-se que vários tipos de tumores expressam inibidores do sistema complemento como mecanismo de evasão do sistema imune. Em estudos publicados anteriormente, observou-se expressão positiva de inibidores do sistema complemento como DAF, MCP e CD59. A expressão de CD59 é constitutiva na mucosa cérvico-vaginal, ao passo que DAF e MCP aparecem nas camadas mais superiores e mais basais do epitélio, respectivamente. Além disso, DAF e CD59 são expressas na JEC, ao passo que MCP não o é. Em lesões precursoras associadas ao HPV, observa-se aumento da expressão de DAF e MCP e perda do padrão de expressão. Em tumores, essa desorganização na expressão de DAF e MCP aumenta. Em algumas regiões, a expressão é totalmente nula e em outras, muito alta. Além disso, observa-se aumento da expressão de alguns desses inibidores no estroma adjacente aos tumores.

Uma proteína do sistema complemento que é associada a tumores é a subunidade C5a. Como C3, C5 é clivada em duas subunidades: C5b faz parte da cascata que forma o complexo MAC e C5a, com função quimiotática. Em tumores, observou-se que C5a pode recrutar células mieloderivadas supressoras que inibem a função antitumoral de células T. Trabalhos de grupos independentes, utilizando modelos animais, mostraram alta concentração de C5a em tumores associados ao HPV16[11].

RESPOSTAS CELULARES

A resposta celular antiviral é fundamental no controle das infecções virais. Uma vez infectada por um vírus, uma célula entra no chamado estado antiviral. Nesse estado, a célula bloqueia a síntese de DNA e de proteínas, dificultando, com isso, o prosseguimento da infecção. O mesmo pode ser dito para bactérias intracelulares. O principal mecanismo de resposta antiviral é mediado por IFN tipo I (IFNα e β). Essa citocina é produzida pelas células infectadas após ativação de vias de sinalização, como as disparadas por TLR, passando pela ativação de IRF1 e IRF3 e também pela ativação de NFκB. IFN é secretado e, ligando-se a receptores na membrana das células vizinhas, induz o mesmo estado antiviral nelas, independentemente de estarem infectadas pelo vírus. Com isso, a infecção é controlada antes de chegar às células vizinhas da inicialmente infectada. Obviamente, os vírus selecionaram, ao longo do tempo, mecanismos de evasão desse sistema. HPV, por exemplo, ao infectar uma célula, inibe diretamente as vias de IRF1 e IRF3. No caso de IRF1, a oncoproteína E7 interage diretamente com o fator de transcrição, mas não com o DNA, recrutando para o promotor dos genes-alvo de IRF1 o fator HDAC, que remove os radicais acetil dos resíduos de lisina nas histonas, estabilizado fortemente as interações eletrostáticas entre as lisinas e a cadeia de fosfatos do DNA. A interação entre os resíduos de lisina e os grupos fosfato do DNA dificulta o acesso da maquinaria de transcrição a promotores gênicos. Esse é um efeito direto de HPV sobre a ativação da expressão de genes pró-inflamatórios, antivirais[12].

APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS

Além de moléculas solúveis, diversos tipos celulares fazem parte do sistema de vigilância imunológica dos epitélios. No epitélio cérvico-vaginal, assim como em outros, observam-se células como as de Langerhans (células dendríticas residentes em epitélios), macrófagos, neutrófilos e linfócitos intraepiteliais. Há autores que discutem a possibilidade de haver um órgão linfoide associado à mucosa cérvico-vaginal, devido à presença de células apresentadoras de antígenos, linfócitos T, linfócitos B e IgA, IgG e IgM[13].

Além disso, em alguns sítios, como a zona de transição entre vagina e colo, observa-se acúmulo de linfócitos B, como será discutido adiante. Linfócitos T CD4 e CD8 são mais frequentes na mucosa cervical, sendo os CD8 os mais frequentes. Como esperado, células dendríticas também são mais abundantes na cérvice. Macrófagos, que também são considerados apresentadores de antígenos profissionais, residem na mucosa cérvico-vaginal, sendo discutido, por vários grupos de pesquisa, o seu papel no desenvolvimento de tumores do colo uterino após infecção por HPV.

As células apresentadoras de antígenos profissionais são as células dendríticas, os macrófagos e os linfócitos B. Essas células são capazes de apresentar antígenos, tanto pela via de MHC (ou HLA) classe I como pela via de MHC classe II, para linfócitos CD8 e CD4, respectivamente. Todas as células nucleadas apresentam antígenos pela via de classe I. Isso ocorre porque qualquer célula é potencial alvo de infecção viral, sendo os patógenos intracelulares obrigatórios, como vírus, eliminados por indução de morte da célula hospedeira. Isso é feito por células NK ou CD8, que só conseguem ligar-se à célula-alvo (no caso, a célula hospedeira do vírus) mediante o MHC classe I. As apresentadoras de antígenos profissionais, por sua vez, são capazes de fagocitar e processar patógenos, incluindo os extracelulares, e apresentá-los pela via de MHC classe II para os linfócitos T CD4.

As células do nosso organismo apresentam antígenos próprios para o sistema imune o tempo todo; porém, normalmente, não se observa disparo de respostas contra antígenos próprios. As células dendríticas são as principais apresentadoras de antígenos, sendo consideradas, por diversos autores, as únicas capazes de iniciar a ativação de linfócitos T previamente não ativados (*naive*). As células dendríticas encontram-se nos tecidos periféricos em um estado conhecido como imaturo. Nesse estado, essas células apresentam antígenos de forma transiente, ou seja, os complexos MHC circulam entre a membrana e as organelas internas, de forma que o tempo de exposição de um determinado antígeno na superfície é relativamente curto. Essas células também não secretam citocinas capazes de estimular células T e não expressam moléculas coestimuladoras, que também são importantes para a ativação de linfócitos T. Além disso, elas ficam nos tecidos periféricos, fisicamente sepa-

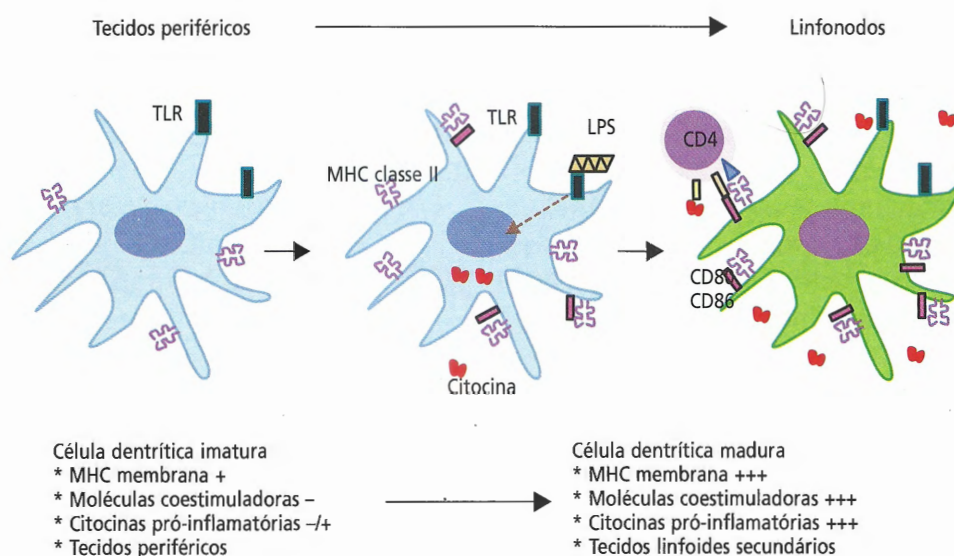



Figura 8.4 – Células dendríticas imaturas ativadas por padrões moleculares associados a patógenos (por exemplo, LPS presentes em parede de bactérias) sofrem ativação de vias de sinalização a partir de receptores na superfície celular, como os TLR, que culminam com o aumento da apresentação de antígenos e a expressão de moléculas coestimuladoras e de citocinas. Esse processo de ativação termina nos órgãos linfoides secundários, para onde as células dendríticas migram após estimulação nos tecidos periféricos, onde estas encontram linfócitos CD4 *naive*, no exemplo CD4, e promovem a ativação deles, ligando com isso a resposta inata à resposta adaptativa.

978-85-4120-024-0

radas das células T *naive*, que migram pelos linfonodos. Ao receber um estímulo originado por patógenos, vias de sinalização específicas são disparadas nas células dendríticas, ocasionando alteração do repertório proteico das próprias, mediante transcrição e tradução *de novo*, e aumento do tempo em que os complexos MHC ficam na superfície. Com isso, há aumento da eficiência da apresentação de antígenos do patógeno em questão e a migração das células dendríticas dos tecidos periféricos para os linfonodos. Nesse sítio, as células dendríticas podem ativar células T, gerando resposta efetora contra um antígeno específico (Figura 8.4). Entre as moléculas expressas nas células dendríticas durante o processo de ativação descrito anteriormente, estão as coestimuladoras, como CD80, CD86 e CD40, e citocinas, como IL-12, essencial para o disparo de respostas de linfócitos CD4 Th1.

HPV e atividade de células apresentadoras de antígeno profissionais

A apresentação de antígenos é essencial para o disparo de respostas adaptativas contra um patógeno e também para o reconhecimento das células-alvo pelos linfócitos ativados. As células apresentadoras de antígenos conseguem traduzir, para os linfócitos T, os sinais recebidos por elas no tecido infectado. Com isso, se a célula apresentadora expressa citocinas pró-inflamatórias e moléculas coestimuladoras, como demonstrado na Figura 8.4, os linfócitos que reconhecem especificamente os antígenos apresentados são ativados, passam por uma fase conhecida como expansão clonal, na qual milhares de células com a mesma especificidade são geradas, e montam a chamada resposta efetora. Essa resposta consiste nos próprios linfócitos ativados e também nos elementos da resposta inata que podem ser recrutados e ativados pelos linfócitos efetores para eliminar o patógeno em questão. Por outro lado, se as células apresentadoras exibem apenas um antígeno, sem sinais que indiquem perigo, os linfócitos T podem ficar anérgicos ou tornarem-se reguladores. Esses linfócitos não reagirão contra o antígeno, podendo, no caso dos reguladores, inibir respostas efetoras contra o antígeno em questão. Esse mecanismo de controle é essencial, sendo conhecido como tolerância periférica. Por um lado, a ausência de tolerância periférica poderia levar à resposta descontrolada contra antígenos próprios. Por outro, muitos patógenos, principalmente os que estabelecem infecções persistentes, conseguem de forma, em geral, indireta induzir fenótipo regulador em linfócitos T. É o que se observa, por exemplo, em pacientes com câncer do colo uterino, o que será discutido posteriormente neste Capítulo.

Em mucosas infectadas com HPV, observa-se redução das células de Langerhans em comparação com as regiões adjacentes, livres de HPV. Queratinócitos que expressam oncoproteínas de HPV apresentam inibição da molécula de adesão E-caderina, molécula utilizada pelas células dendríticas para locomoção pelos epitélios. Com isso, o número de células dendríticas que poderiam apresentar antígenos das células infectadas é reduzido. Além disso, o ciclo de vida do HPV é um ciclo não lítico, ou seja, os vírions gerados em uma infecção produtiva são liberados para o ambiente ao mesmo tempo em que as células do epitélio descamam, de forma que sinais de perigo que poderiam ativar células apresentadoras, como ATP, gerado durante o processo de necrose, e fosfatidilserina, lipídio apresentado na face externa da membrana plasmática de células em apoptose, não são liberados no tecido infectado. A expressão de CCL20, quimiocina que controla a migração de células de Langerhans para os epitélios, também é alterada em células que expressam oncoproteínas de HPV. As oncoproteínas E6 e E7 inibem a expressão de CCL20, o que reduz o recrutamento de células de Langerhans para os sítios infectados. Interessantemente, dados da literatura indicam que tumores já desenvolvidos no colo uterino apresentam aumento da expressão de E-caderina, indicando que o controle da expressão dessa molécula é alterado durante a história natural dessas lesões[14,15].

A enzima IDO, indoleamina-2,3-dioxigenase, pode ser expressa em células apresentadoras de antígenos. Quando expressa, induz fenótipo regulador (supressor) em linfócitos T. Há indicações de aumento de expressão dessa enzima no infiltrado inflamatório, incluindo células dendríticas, em lesões do colo uterino, dependendo do grau delas. Ou seja, a inibição da atividade ou alteração do fenótipo de células dendríticas parece ter associação com o desenvolvimento de lesões do colo uterino causadas por HPV. Por outro lado, demonstrou-se recentemente, em modelo experimental, que, em infecções com *Chlamydia*, células dendríticas do trato genital inferior expressam IL-10, citocina supressora, inibindo com isso a resposta CD4 Th1 contra a bactéria. Isso ocorre após vários dias da infecção, de forma que uma resposta inicial é induzida, mas, posteriormente, inibida por células dendríticas locais. As respostas CD4 Th1 são importantes para o controle das infecções não apenas por *Chlamydia*, mas, como será visto adiante, por HPV e também por HSV[14,16,17].

Outra população de células importante para apresentação antigênica e modulação do fenótipo de células T é a de macrófagos, que são recrutados para tecidos a partir do sangue onde circulam como células imaturas, conhecidas como monócitos. Recrutados para os tecidos periféricos, os monócitos diferenciam-se em macrófagos, que podem assumir diferentes fenótipos, dependendo do microambiente local. Os macrófagos podem ficar nos tecidos como macrófagos residentes não ativados, servindo como vigilantes dos tecidos. Como as células dendríticas, o contato com patógenos dispara vias de sinalização

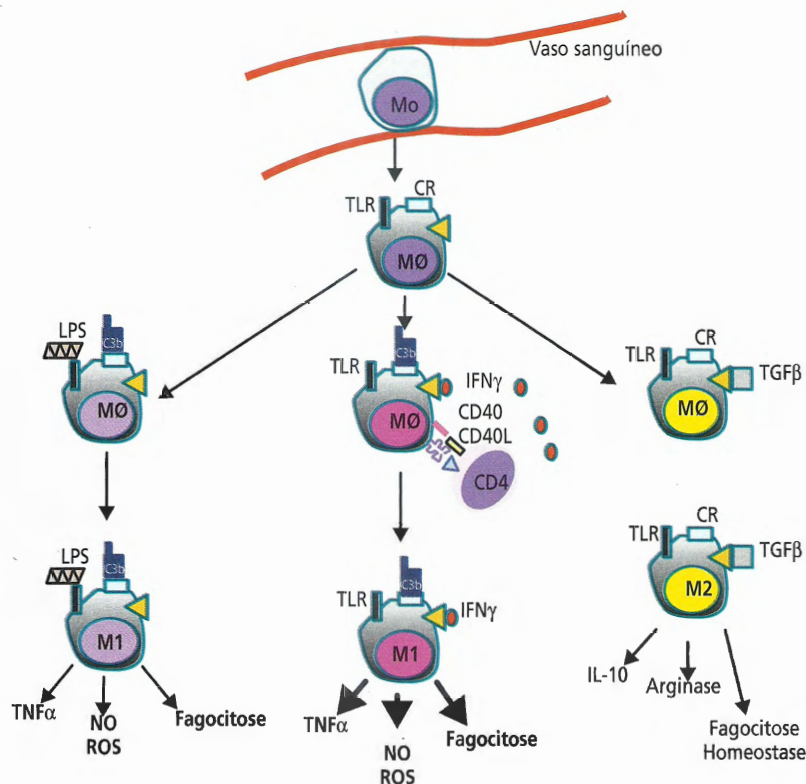



Figura 8.5 – Mo deixam a circulação e migram para tecidos periféricos, onde se diferenciam em MØ, que podem ser ativados no tecido, dependendo do tipo de estímulo. Padrões moleculares associados a patógenos, como LPS, por exemplo (ver Figura 8.4), ou fragmentos de proteínas do sistema complemento ativado podem induzir fenótipo citotóxico nos macrófagos, classicamente conhecidos como M1. Se a resposta adaptativa tiver sido ativada por conta da infecção, e linfócitos CD4 Th1, secretando IFNγ, forem recrutados para o tecido, essa citocina poderá aumentar muito a atividade dos macrófagos M1, levando à destruição completa dos patógenos. Por outro lado, macrófagos com aumento da atividade de arginase e da expressão de IL-10, que mantém a homeostase tecidual mediante fagocitose de células mortas, são observados em tecidos onde há a expressão de citocinas reguladoras ou anti-inflamatórias, como TGFβ, por exemplo.

978-85-4120-024-0

que ativam os macrófagos residentes, fazendo que estes também aumentem sua capacidade de apresentação de antígenos, mas que também secretem citocinas e produzam espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, podendo assumir função citotóxica. Em geral, o máximo da atividade citotóxica ocorre quando macrófagos são ativados por linfócitos mediante sinalização por citocinas específicas. Nesse caso, os macrófagos funcionam como mecanismo efetor da resposta adaptativa (Figura 8.5). Alternativamente, o microambiente para onde os monócitos são recrutados pode ser formado por moléculas anti-inflamatórias como TGFβ. Nesse caso, é possível que macrófagos diferenciem-se dos chamados alternativamente ativados (M2), com papel na homeostase do tecido.

Os macrófagos também são células apresentadoras de antígenos profissionais, de forma que macrófagos com fenótipo M1 podem induzir ativação de linfócitos T, por exemplo, por meio de interação CD40/CD40L e produção de citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, macrófagos M2 não são bons indutores de respostas imunes. Ao contrário, a atividade de arginase pode levar à depleção local de arginina, inibindo com isso a expansão clonal de linfócitos. Mais ainda, essa população de macrófagos pode secretar citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGFβ, que podem induzir respostas reguladoras em células T em vez de resposta Th1. Em lesões do colo uterino associadas ao HPV, tem-se observado o aumento do número de macrófagos de forma proporcional ao grau da lesão. Ou seja, quanto maior o grau da lesão, maior o número de macrófagos por área de lesão avaliada. Interessantemente observou-se, em pacientes, que esses macrófagos não apresentam expressão de iNOS, enzima que medeia a produção de NO, parte, consequentemente, da atividade citotóxica dessas células. Em modelo experimental, demonstrou-se que macrófagos que infiltram tumores associados ao HPV-16 apresentam expressão de arginase e características de macrófagos M2. Alguns pesquisadores observaram também que células mieloderivadas supressoras podem infiltrar tumores associados ao HPV-16, também em modelos experimentais, ou, ainda, podem mediar inativação de células T no baço de camundongos[18,19,20,21].

HPV e apresentação de antígenos via MHC classe I

Como mencionado anteriormente, todas as células nucleadas do nosso organismo são capazes de apresentar antígenos pela via chamada de classe I. Nesse caso, os antígenos apresentados são intracelulares, ou seja, suas proteínas estão disponíveis no citoplasma para processamento e apresentação, e necessariamente esses antígenos são apresentados para linfócitos T CD8. Quando os linfócitos T CD8 reconhecem uma célula-alvo, eles promovem a morte dela, mediante a inserção de proteínas, chamadas perforinas, na membrana da célula-alvo e a liberação de granzimas que ativam a cascata de caspases na célula-alvo. A interação entre o linfócito CD8 e a célula-alvo é feita por meio do TCR e do MHC classe I contendo o peptídio específico para ela. Com isso, os vírus que são parasitos intracelulares obrigatórios e também bactérias intracelulares desenvolveram mecanismos para reduzir a apresentação de antígenos via MHC classe I como mecanismo de evasão às respostas CD8 citotóxicas. A maquinaria de apresentação de antígenos para MHC classe I é iniciada no citoplasma a partir da degradação de proteínas pelo sistema proteassomo. Em seguida, os peptídios gerados são bombeados para o retículo endoplasmático, à custa de energia, por uma bomba de transporte, TAP (*transporter associated with antigen processing*). Esta fica na membrana do retículo endoplasmático, em geral associada a uma chaperona, tapasina, que mantém complexos MHC classe I imaturos próximos à TAP, para que os peptídios que chegam ao retículo estejam disponíveis para possível ligação ao MHC. Se um peptídio se ligar à fenda de um dos complexos MHC, este se tornará maduro e migrará através das vesículas do complexo de Golgi até a superfície da célula. Vários tipos de vírus apresentam mecanismos de evasão que

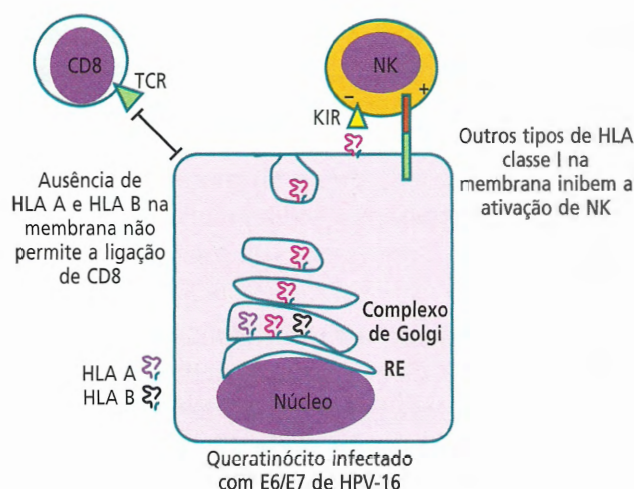



Figura 8.6 – Enquanto complexos MHC ou HLA classe I tipos A e B ficam retidos no complexo de Golgi, outros tipos chegam à membrana, de forma que as células CD8 não são capazes de se ligar à membrana da célula-alvo, e as células NK são inibidas.

reduzem a apresentação de antígenos, por exemplo, por meio da redução da expressão de TAP e tapasina, ou, ainda, inibem a expressão de LMP2 e LMP7, subunidades do sistema proteassomo que são induzidas quando a célula dispara respostas antivirais. Tanto o HPV como o o HSV apresentam mecanismos para reduzir a apresentação de antígenos via MHC classe I. O HPV apresenta um mecanismo interessante, no qual moléculas de HLA classe I A e B ficam retidas nas vesículas do complexo de Golgi, enquanto outros tipos HLA chegam à membrana. Com isso, as moléculas mais importantes para apresentação para linfócitos CD8 não estão disponíveis. Já o restante das moléculas de classe I presentes na superfície é suficiente para inibir a atividade citotóxica de células NK, que recebem estímulo inibitório a partir da ligação de receptores KIR a moléculas MHC classe I (Figura 8.6)[22].

RESPOSTAS ADAPTATIVAS NO TRATO GENITAL INFERIOR

Como dito anteriormente, o trato genital é infiltrado por linfócitos T e B. Em sua grande maioria, a eliminação de patógenos que infectam o trato genital feminino inferior é feita por linfócitos CD4 Th1. Os linfócitos CD4 têm papel importante nas respostas adaptativas, tanto celulares quanto humorais. Eles determinam o tipo de troca de isótipo em linfócitos B, estimulam a proliferação de outros linfócitos e, ainda, apresentam mecanismos efetores mediante a ativação de elementos do sistema inato. A maior parte desses efeitos é mediada por citocinas produzidas pelos linfócitos CD4. Infecções por *Chlamydia*, HPV e HSV são controladas por linfócitos T, principalmente CD4 Th1, embora haja um papel claro de linfócitos CD8 na eliminação de células infectadas por esses patógenos. Especificamente em relação ao HPV, observa-se, em mulheres positivas para o DNA viral, porém assintomáticas, que linfócitos do sangue periférico dessas pacientes proliferam *in vitro* após estímulo com peptídios representantes das sequências proteicas E2, E6 e E7 (dados sobre HPV-16) e também secretam citocinas IL-2, IL-5, IL-10, TNFα e IFNγ. Além disso, observa-se, em verrugas em regressão, infiltrado de linfócitos CD8 citotóxicos. Interessantemente, em mulheres com câncer do colo uterino, os linfócitos circulantes não são capazes de proliferar em resposta aos mesmos conjuntos de peptídios citados anteriormente, sendo a IL-10 a única citocina produzida por eles. Após esses achados, descobriu-se que mulheres com tumores do colo uterino apresentavam resposta T reguladora de linfócitos T CD4, capaz de inibir outras células efetoras. Interessantemente, observou-se que a razão entre linfócitos T citotóxicos e reguladores em tumores primários de mulheres sem metástase era indicativa de prognóstico de progressão da doença, de forma que a razão CD8/CD4 reguladora alta é indicativa de melhor prognóstico do que a razão CD8/CD4 reguladora baixa[23,24]. Contrariamente a estudos de risco que relacionam haplótipos de HLA com risco de infecção por HPV e progressão de doença, onde são verificados alguns haplótipos protetores e outros que conferem maior risco, os estudos com receptores de células T não indicaram um tipo que se liga preferencialmente a peptídios de HPV. Os clones de receptores variam entre mulheres, assim como os epítopos imunodominantes[25].

É importante enfatizar que a maior parte das mulheres infectadas por HPV é capaz de montar respostas antivirais eficientes, e não apenas eliminar o vírus, além de promover regressão de lesões, inclusive de uma porcentagem das lesões de alto grau como NIC III.

Atualmente, vários grupos de pesquisa buscam formas de quebrar o quadro de tolerância estabelecido por lesões associadas ao HPV, pesquisando tipos de imunoterapia que permitam a inibição da progressão tumoral ou a eliminação da lesão e do vírus. Há vários tipos de imunoterapias em teste, principalmente contra HPV-16. Estas variam entre utilização de *Listeria monogenesis* modificada a peptídios longos que compreendem as sequências das proteínas E6/E7. Os resultados variam de um protocolo para outro, sendo o que utiliza os peptídios longos o mais bem-sucedido atualmente. Nos estudos que utilizam peptídios, observou-se que as pacientes com lesões menores apresentavam melhores resultados com picos de IFNγ e IL-5 após o início do tratamento. Por outro lado, mulheres com lesões grandes apresentavam maiores números de linfócitos CD4 reguladores (Foxp3+) e menor razão IFNγ/IL-10 após imunização, indicando que o tumor contribui fortemente para o quadro de tolerância estabelecido nas pacientes[26]. Interessantemente, polimorfismos na região promotora do gene IL-10 podem conferir maior risco de progressão das lesões causadas por HPV, quando a alteração leva a maior expressão de IL-10. Além desses dados epidemiológicos e dos resultados descritos anteriormente, descreveu-se, em modelos experimentais, que a IL-10 produzida por macrófagos infiltrantes dos tumores HPV-16 faz parte do mecanismo de estabelecimento de tolerância aos antígenos de HPV e indução de fenótipo regulador em células T [27,28,29].

A indução da expressão de IL-5 em pacientes infectadas após estímulo de linfócitos com peptídios correspondentes a HPV sugere ativação de respostas humorais, além de respostas celulares. Aproximadamente 50% das mulheres infectadas com HPV desenvolvem respostas humorais. Os estudos medem, em geral, resposta contra as proteínas do capsídio L1 e L2. Essas proteínas são imunogênicas e ativam células dendríticas tanto mieloides como plasmocitoides. Os títulos de anticorpos alcançados por pacientes infectadas naturalmente, porém, são relativamente baixos e tendem a diminuir com o tempo. Os anticorpos gerados podem ser neutralizantes, podendo proteger a paciente contra uma nova infecção pelo mesmo tipo de HPV, porém estudos mostram que os anticorpos não têm efeito algum sobre infecções já estabelecidas ou lesões. Com isso, as vacinas disponíveis atualmente contra HPV são profiláticas e não terapêuticas, conforme discutido em outros capítulos deste livro.

Infecções por HSV-2 também podem disparar respostas celulares e humorais, embora as respostas CD4 Th1 pareçam as mais importantes para o controle da infecção e a eliminação do vírus, o mesmo sendo observado em infecções com *Chlamydia*. Por outro lado, diferentes variantes de *Neisseria gonorrhoeae* induzem diferentes perfis de citocinas, com um balanço IL-10/IL-12 variável em células dendríticas de acordo com os tipos de carboidratos presentes em sua membrana, o que leva à diferenciação de diferentes fenótipos de linfócitos CD4. É possível que esse seja um mecanismo de evasão, cuja ativação de respostas humorais, ao invés de respostas celulares, assegure a sobrevivência da bactéria no hospedeiro.

Neste capítulo, buscou-se resumir informações atuais sobre infecções no trato genital feminino inferior, principalmente por HPV. As respostas contra os patógenos são diversas, assim como os mecanismos de evasão por eles apresentados. Deve-se ter em mente que, ao ocorrer uma infecção, além de uma série de fatores genéticos como haplótipo de HLA, polimorfismo em genes importantes para a resposta imune, fatores cinéticos e termodinâmicos também colaboram para determinar o destino da infecção.

Referências

1. ABUL, K.; ABBAS, A. H.; LICHTMAN, S. P. **Cellular and Molecular Immunology**, 6. ed., Saunders Elsevier, 2009.
2. HERBST-KRALOVETZ, M. M.; QUAYLE, A. J.; FICARRA, M. et al. Quantification and comparison of toll-like receptor expression and responsiveness in primary and immortalized human female lower genital tract epithelia. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 59, p. 212-224, 2008.

3. ANDERSEN, J. M.; AL-KHAIRY, D.; INGALLS, R. R. Innate immunity at the mucosal surface: role of toll-like receptor 3 and toll-like receptor 9 in cervical epithelial cell responses to microbial pathogens. In: BIOLOGY OF REPRODUCTION, v. 74, p. 824-831, 2006.
4. COLE, A. M.; COLE, A. L. Antimicrobial polypeptides are key anti-HIV-1 effector molecules of cervicovaginal host defense. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 59, p. 27-34, 2008.
5. ZANETTI, M. The Role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 7, p. 196-179, 2004.
6. GANZ, T. Defensins: anti-microbial peptides of innate immunity. **Nature Rev. Immunol.**, v. 3, p. 710-720, 2003.
7. STOCK, S. J.; DUTHIE, L.; TREMAINE, T. et al. Elafin (SKALP/trappin-2/proteinase inhibitor-3) is produced by the cervix in pregnancy and cervicovaginal levels are diminished in bacterial vaginosis. **Reproduct. Sci.**, v. 16, p. 1125-1134, 2009.
8. SIMPSON, K. L.; JONES, A.; NORMAN, S. et al. Expression of the complement regulatory proteins decay accelerating factor (DAF, CD55), membrane cofactor protein (MCP, CD46) and CD59 in the normal human uterine cervix and in premalignant and malignant cervical disease. **Am. J. Pathol.**, v. 151, p. 1455-1467, 1997.
9. EDWARDS, J. L.; ENTZ, D. D.; APICELLA, M. A. Gonococcal phospholipase D modulates the expression and function of complement receptor 3 in primary cervical epithelial cells. **Infec. Immun.**, v. 71, p. 6381-6391, 2003.
10. LIU, F.; LIAO, Q.; LIU, Z. Mannose-binding lectin and vulvovaginal candidiasis. **Internat. J. Gynecol. Obstetrics**, v. 92, p. 43-47, 2006.
11. MARKIEWSKI, M. M.; DEANGELIS, R. A.; BENENCIA, F. et al. Modulation of the antitumor immune response by complement. **Nat. Immunol.**, v. 9, p. 1225-1235, 2008.
12. BOCCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; VILLA, L. L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 1905-1912, 2010.
13. PUDNEY, J.; QUAYLE, A. J.; ANDERSON, D. J. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. In: BIOLOGY OF REPRODUCTION, v. 73, p. 1253-1263, 2005.
14. AGRAWAL, T.; VATS, V.; WALLACE, P. K. et al. Role of cervical dendritic cell subsets, co-stimulatory molecules, cytokine secretion profile and beta-estradiol in development of sequalae to Chlamydia trachomatis infection. **Reproduc. Biol. Endocrinol.**, v. 6, p. 46-56, 2008.
15. HUBERT, P.; CABERG, J. H.; GILLES, C. et al. E-cadherin-dependent adhesion of dendritic and Langerhans cells to keratinocytes is defective in cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions. **J. Pathol.**, v. 206, p. 346-355, 2005.
16. MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 1147-1154, 2007.
17. NAKAMURA, T.; SHIMA, T.; SAEKI, A. et al. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. **Cancer Sci.**, v. 98, p. 874-881, 2007.
18. HAMMES, L. S.; TEKMAL, R. R.; NAUD, P. et al. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression – clinicopathological correlation. **Gynecol. Oncol.**, v. 105, p. 157-165, 2007.
19. MAZIBRADA, J.; RITTÀ, M.; MONDINI, M. et al. Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. **Gynecol. Oncol.**, v. 108, p. 112-120, 2008.
20. KOBAYASHI, A.; WEINBERG, V.; DARRAGH, T. et al. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. **Mucosal Immunol.**, v. 1, p. 412-420, 2008.
21. LEPIQUE, A. P.; DAGHASTANLI, K. R.; CUCCOVIA, I. M. et al. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. **Clin. Cancer Res.**, v. 15, p. 4391-4400, 2009.
22. CAMPO, M. S.; GRAHAM, S. V.; CORTESE, M. S. et al. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. **Virology**, v. 407, p. 137-142, 2010.
23. VAN DER BURG, S. H.; PIERSMA, S. J.; DE JONG, A. et al. Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 12087-12092, 2007.
24. PIERSMA, S. J.; JORDANOVA, E. S.; VAN POELGEEST, M. I. et al. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. **Cancer Res.**, v. 67, p. 354-361, 2007.
25. DE ARAUJO SOUZA, P. S.; SICHERO, L.; MACIAG, P. C. HPV variants and HLA polymorphisms: the role of variability on the risk of cervical cancer. **Future Oncol.**, v. 5, p. 359-370, 2009.
26. VAN DER BURG, S. H.; MELIEF, C. J. Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 23, p. 252-257, 2011.
27. SYRJÄNEN, S.; NAUD, P.; SARIAN, L. et al. Immunosuppressive cytokine interleukin-10 (IL-10) is up-regulated in high-grade CIN but not associated with high-risk human papillomavirus (HPV) at baseline, outcomes of HR-HPV infections or incident CIN in the LAMS cohort. **Virchows Arch.**, v. 455, p. 505-515, 2009.
28. BERMUDEZ-MORALES, V. H.; GUTIERREZ, L. X.; ALCOCER-GONZALEZ, J. M. et al. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. **Cancer Invest.**, v. 26, p. 1037-1043, 2008.
29. BOLPETTI, A.; SILVA, J. S.; VILLA, L. L. et al. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in human papillomavirus 16 tumor growth. **BMC Immunol.**, v. 7, p. 11-27, 2010.
30. PALMROTH, J.; NAMUJJU, P.; SIMEN-KAPEU, A. et al. Natural seroconversion to high-risk human papillomaviruses (hrHPVs) is not protective against related HPV genotypes. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 42, p. 379-384, 2010.
31. STANLEY, M. A. Immune responses to human papilloma viruses. **Indian J. Med. Res.**, v. 130, p. 266-276, 2009.

Capítulo 9

Critérios Citológicos de Malignidade

Cinthia Gandolfi Boer
Vânia Ramos Sela da Silva

INTRODUÇÃO

A atividade biológica da célula é refletida em sua morfologia e expressa, principalmente, nas estruturas celulares do núcleo. A morfologia do citoplasma, por sua vez, exibe a diferenciação e revela a atividade funcional da célula. Diferentes tipos de processos patológicos podem afetar as células, entretanto as respostas celulares a eles são limitadas[1].

A arquitetura intacta do núcleo é essencial para a regulação dos processos biológicos complexos. A proliferação e a diferenciação anormais das células cancerosas podem ser resultado de modificações significativas na regulação da expressão gênica decorrentes de pequenas mudanças na organização do ambiente nuclear[2]. Células cancerosas frequentemente apresentam instabilidade genética, com alterações no número e na estrutura de seus cromossomos. A instabilidade genética é um passo importante para a iniciação do processo de carcinogênese cervical associada ao HPV, desenvolvendo-se nos estágios iniciais da neoplasia cervical, podendo ser detectada, até mesmo, nas lesões pré-malignas[3,4,5].

Alterações na arquitetura das células e dos tecidos, juntamente com a instabilidade genética, constituem as duas propriedades fundamentais que definem alguns tumores como malignos. O diagnóstico definitivo dos cânceres é realizado por um patologista mediante avaliação das estruturas celular e tecidual[6]. A citopatologia, porém, é importante no rastreamento para detecção precoce do câncer do colo uterino, uma vez que tem a capacidade de examinar um grande número de pacientes assintomáticas na tentativa de detectar

a doença em estágio pré-clínico. Assim, o exame citológico representa, atualmente, a principal estratégia de rastreamento para identificação de lesões cervicais pré-cancerosas[1,7].

A citopatologia diagnóstica tem como base as alterações citológicas características observadas nas células cancerosas. As alterações clássicas que, quando observadas ao microscópio óptico, conduzem ao diagnóstico de malignidade são predominantemente nucleares. Essas alterações incluem aumento do tamanho do núcleo, particularmente da relação núcleo/citoplasma, alterações na membrana nuclear, incluindo angulações, sulcos e espessamento, alterações nucleolares e no padrão da cromatina[8,9,10].

O estudo das lesões pré-cancerosas e cancerosas do colo uterino é essencial para o entendimento dos eventos que ocorrem no câncer. A observação das alterações nucleares é especialmente importante nos esfregaços citológicos, onde a informação sobre a arquitetura do tecido foi perdida. O grau de alterações nucleares é progressivo, dependendo do estágio da lesão[6,7].

MECANISMOS MOLECULARES DE DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER CERVICAL E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CELULARES ASSOCIADAS

Mudanças genéticas (alterações na sequência do DNA da célula) e epigenéticas (alterações no padrão de expressão gênica sem que haja mudança na sequência do DNA) foram observadas nos passos iniciais da progressão maligna da cérvice uterina. Tanto alterações genéticas estáveis (mutações) quanto modificações epigenéticas podem levar à ativação de oncogenes e/ou à inativação dos genes supressores do crescimento tumoral[5,11].

As proteínas virais E6 e E7 do HPV interagem com muitas proteínas celulares e, particularmente, se ligam a duas proteínas supressoras de tumor da célula do hospedeiro, impedindo-as de exercer suas funções. Uma dessas proteínas é a p53, normalmente presente em concentrações muito baixas nas células, mas que é rapidamente acumulada quando ocorre lesão do DNA. O aumento dos níveis de p53 desempenha um papel crítico na estimulação da transcrição de genes que resultam na parada do ciclo celular para que o dano do DNA possa ser reparado. Alternativamente, a célula pode responder à agressão, dando início à chamada morte celular programada ou apoptose. Células que expressam E6 mantêm os níveis de p53 baixos por induzir sua degradação acelerada, alterando a resposta normal ao dano do DNA e favorecendo o acúmulo de mutações genômicas. A outra proteína é a pRb, que parece atuar como um dos principais freios da progressão do ciclo de divisão celular. Essa proteína liga-se fortemente a proteínas reguladoras de genes da família E2F, impedindo, dessa forma, a replicação do DNA. A ligação de E7 à pRb libera o fator de transcrição E2F, que ativa a expressão de genes que estimulam a síntese de DNA na célula[5,11,12].

As duas principais mudanças epigenéticas observadas no desenvolvimento do câncer são a metilação do DNA e a acetilação de histonas, sendo ambas as modificações covalentes. A ativação da telomerase desempenha papel-chave na imortalização de células cancerosas, sendo aparentemente necessária para garantir a proliferação celular. Essa ativação da telomerase parece estar relacionada com metilação alterada[11]. Os telômeros consistem em sequências nucleotídicas específicas presentes em cada uma das extremidades de um cromossomo. Essa sequência repetida simples é periodicamente estendida pela enzima telomerase, o que permite ao cromossomo ser completamente replicado. Entretanto, exceto para células-tronco, em vários outros tipos celulares o nível da telomerase é reduzido, fazendo que, a cada divisão celular, os telômeros sofram encurtamento progressivo. Isso impede a replicação do cromossomo em determinado momento, e a célula perde sua capacidade de divisão, disparando a senescência celular. Esse encurtamento dos telômeros parece funcionar como um "relógio", conferindo à célula tempo normal de vida proliferativa[5,11,13]. Alguns traba-

lhos mostram que a proteína E6 do HPV é hábil em estimular a atividade telomerase. Essa característica, em conjunto com a degradação da p53, estaria relacionada com a manutenção da atividade proliferativa das células infectadas[4]. Aspectos relacionados com o HPV e a carcinogênese cervical são detalhados nos Capítulos 7 e 8.

Alterações no padrão da cromatina nuclear

O núcleo da célula eucariótica é delimitado por um envelope nuclear, formado por duas membranas concêntricas, conectadas, a intervalos regulares, por complexos de poro nuclear, os quais realizam o transporte de moléculas. A membrana nuclear externa é contínua com a membrana do retículo endoplasmático[5]. A membrana nuclear interna contém proteínas que atuam como pontos de ligação para a cromatina e para a lâmina nuclear. Esta é uma estrutura extremamente dinâmica, que se associa com a cromatina durante a interfase, sendo constituída por uma rede de filamentos intermediários, que dá suporte mecânico ao envelope nuclear[5,9].

O genoma humano é constituído pela informação genética total distribuída nos cromossomos. Cada molécula de DNA linear está compactada com proteínas associadas em um cromossomo separado. Uma célula diploide humana contém um total de 46 cromossomos. O DNA de todos os cromossomos é empacotado em uma estrutura compacta com o auxílio de proteínas especializadas, denominadas histonas, e de proteínas cromossômicas não histonas. Cromatina é o complexo formado pela interação dessas proteínas com o DNA nuclear[5,12]. Nos núcleos em interfase, são observados dois tipos de cromatina: uma forma altamente condensada, chamada de heterocromatina; e o restante menos condensado, chamado de eucromatina. A heterocromatina é transcricionalmente inativa e normalmente verificada compactada junto à superfície interna do envelope nuclear, ligada por proteínas da lâmina nuclear. A eucromatina é a porção ativa geneticamente e, em geral, está localizada na parte mais central do núcleo[2,5,9,12].

A cromatina é visível ao microscópio eletrônico como finos filamentos arranjados em uma rede que, em células normais, parece estar uniformemente distribuída através do núcleo[1]. Ao microscópio óptico, a maioria dos núcleos normais parece ter material cromatínico finamente granular e uniformemente distribuído. Durante a interfase, a organização estrutural da cromatina forma a heterocromatina ligada à membrana nuclear (borda cromatínica), a heterocromatina que se estende da membrana nuclear para o centro do núcleo (rede cromatínica) e um compartimento intercromatínico que se situa entre a heterocromatina e contém domínios de eucromatina. O grau e a forma de compactação da heterocromatina dependem da atividade biológica da célula[1,9,10]. A cromatina interfásica mostra um comportamento dinâmico, cujos domínios cromatínicos movem-se mais ou menos aleatoriamente por pequenas distâncias. A cromatina nos domínios da heterocromatina parece mover-se menos que a cromatina eucromatínica, mecanismo importante para a regulação da expressão gênica[14].

No carcinoma escamoso queratinizante, os núcleos variam acentuadamente de tamanho e as membranas nucleares podem ser frequentemente irregulares em configuração. A cromatina é hipercromática, grosseiramente granular e distribuída de forma irregular (Figura 9.1). Muitas células anormais contêm núcleos densos opacos, indicando degeneração celular (Figura 9.2). Nos casos não queratinizantes, os núcleos são redondos ou ovais, podendo também apresentar irregularidades na configuração. A cromatina é hipercromática, grosseiramente agrupada e com distribuição acentuadamente irregular (Figura 9.3)[15,16].

Mudanças na organização da cromatina podem estar associadas a padrões alterados de expressão gênica e são importantes para o processo de transformação maligna[8]. Dentre as prováveis causas de alteração no padrão cromatínico nas células malignas, estão o remodelamento da cromatina, as mudanças nas proteínas da matriz nuclear, as alterações dos poros nucleares, a aneuploidia do DNA e as alterações da lâmina nuclear[9,17].

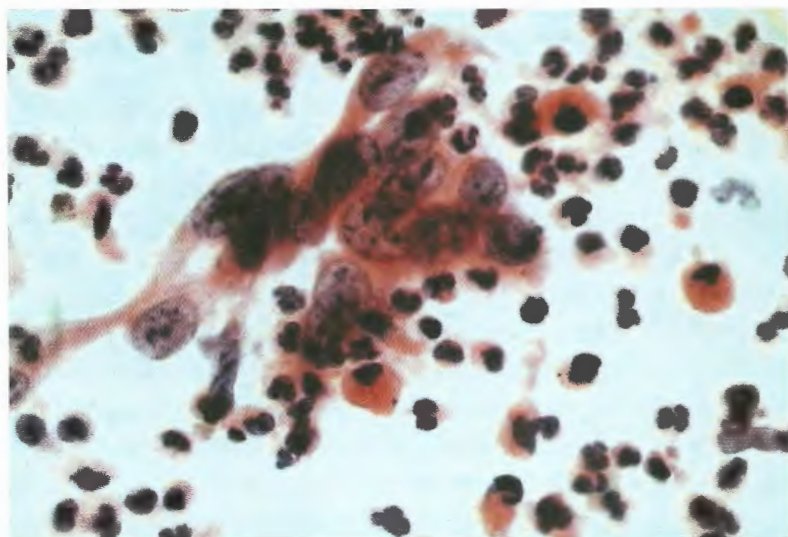



Figura 9.1 – Carcinoma de células escamosas. Agregado de células tumorais demonstrando núcleos hipercromáticos, com cromatina grosseiramente granular e irregularmente distribuída. Observar a queratinização citoplasmática. *400*×.

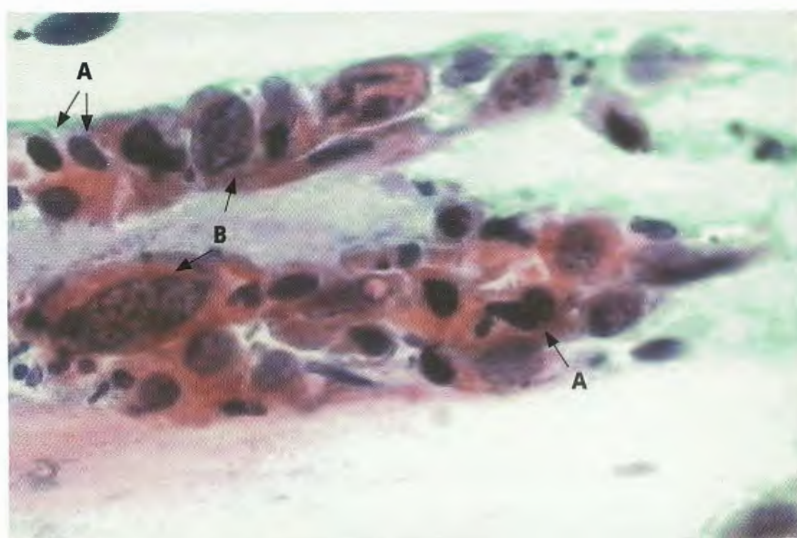



Figura 9.2 – Carcinoma de células escamosas. Agrupamento de células tumorais com queratinização citoplasmática e intenso pleomorfismo nuclear, com frequentes núcleos densos opacos (*A*) e aumento acentuado na relação núcleo/citoplasma (*B*). *400*×.

978-85-4120-024-0

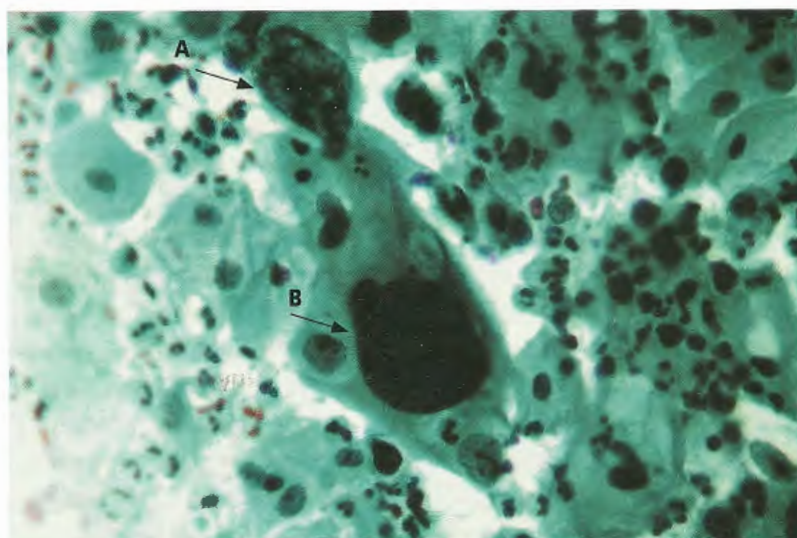



Figura 9.3 – Carcinoma de células escamosas. Observar células exibindo irregularidades na membrana nuclear, cromatina com distribuição acentuadamente irregular e variação na espessura da borda cromatínica (*A*) e aumento marcado na relação núcleo/citoplasma e hipercromasia nuclear (*B*). *400*×.

Remodelamento da cromatina

Durante a ativação ou a repressão de genes, ocorre um remodelamento importante da cromatina. Esse processo pode ocorrer de duas maneiras: reorganização da posição do nucleossomo por fatores remodeladores da cromatina dependentes de ATP e por modificação covalente de histonas[17,18]. Células malignas demonstram alterações na maquinaria de remodelamento da cromatina, afetando, assim, a acessibilidade de genes envolvidos com o início e a progressão da carcinogênese[19]. Cada cromossomo interfásico tende a ocupar um território específico dentro do núcleo. Entretanto, como as células malignas costumam ter a expressão gênica aumentada, a posição do cromossomo pode estar alterada[2,9,17]. Durante o desenvolvimento tumoral, oncogenes podem ser capazes de direcionar o posicionamento dos cromossomos, causando assim ativação transcricional de genes promotores do crescimento e da proliferação celulares e silenciamento de genes que promovem a apoptose[2]. A metilação do DNA pode produzir silenciamento de genes e está relacionada com o remodelamento da cromatina. A acetilação de histonas rompe a estrutura do nucleossomo, levando ao relaxamento do DNA, o que permite o acesso de fatores de transcrição às sequências regulatórias. Assim, a acetilação alterada das histonas causa mudança conformacional em sua própria estrutura, desencadeando mudança na estrutura dos cromossomos e, consequentemente, no padrão da cromatina[9,17].

Mudanças nas proteínas da matriz nuclear

A matriz nuclear é definida como o material insolúvel que permanece no núcleo após várias etapas de extração bioquímica. Embora ainda não exista um consenso sobre sua existência, diversos trabalhos mostram que a matriz nuclear parece funcionar como o esqueleto interno do núcleo, sendo responsável por padrões variados de expressão gênica em diferentes células[5,9,17,20]. A matriz nuclear consistiria, assim, em duas partes: a lâmina nuclear e uma rede de fibras constituídas por proteína e RNA, a qual estaria conectada à lâmina e bem distribuída através do volume nuclear. Estudos revelam mais de 200 proteínas da matriz nuclear. Algumas dessas proteínas parecem estar restritas a células cancerosas ou a estágios definidos da progressão tumoral. Essa mudança pode ter um papel significativo na alteração do padrão cromatínico, podendo também ser útil como marcador tumoral[8,9,17,21].

Alterações dos poros nucleares

A membrana nuclear funciona como uma barreira entre o núcleo e o citoplasma. O transporte dos elementos essenciais ocorre através dos poros nucleares. Diferentes tipos de células cancerosas exibem defeitos nesse sistema de transporte, o que pode levar a um padrão alterado da cromatina nuclear[17].

Aneuploidia do DNA

A maioria das células malignas contém excesso ou perda de cromossomos inteiros, fenômeno conhecido como instabilidade cromossômica, que representa uma das principais causas de aneuploidia[9,22]. Esse fenômeno tem implicações importantes tanto para iniciação do tumor, onde a aneuploidia pode desempenhar um papel causal, quanto na evolução das células tumorais, onde elevadas taxas de desagregação cromossômica podem possibilitar a expansão clonal de células com vantagens proliferativas, potencial metastático ou resistência aos tratamentos químicos. Apesar de sua importância, os mecanismos que conduzem à instabilidade cromossômica na maioria dos cânceres não estão definidos[22]. Em cânceres cervicais associados ao HPV, estudos mostram que a expressão das oncoproteínas virais E6 e E7 pode estar envolvida nesse processo[3]. Um número alterado de cromossomos pode levar à desorganização da cromatina, produzindo um padrão diferente de textura de cromatina[9,17].

Alterações da lâmina nuclear

Importantes processos nucleares, como a manutenção estrutural da membrana nuclear e a organização dos cromossomos durante a interfase,

são dependentes das interações moleculares entre as proteínas da membrana nuclear interna, a cromatina e a lâmina nuclear[9]. Quando forças físicas ou químicas atuam sobre a cromatina, a heterocromatina tende a se agrupar, preferencialmente próximo à periferia do núcleo, situação referida como marginalização da cromatina, fazendo que a eucromatina tenha livre acesso aos substratos do núcleo[1]. Isso é frequentemente notado em núcleos malignos e observado ao microscópio óptico como espessamento irregular da margem nuclear e clareamento central do núcleo. O padrão cromatínico pode ser de aglomerados granulares com distribuição irregular[9,17].

Irregularidades da margem e da forma nucleares

Pleomorfismo nuclear indica variações na forma e no tamanho dos núcleos[12]. Alterações na forma do núcleo estão frequentemente associadas a uma organização alterada da heterocromatina na periferia dos núcleos malignos, com consequente espessamento irregular da margem nuclear (Figura 9.4). Mudanças qualitativas ou quantitativas da lâmina nuclear podem ser responsáveis por alterações da margem e da forma do núcleo, que, por sua vez, podem afetar a organização e o posicionamento dos genes, alterando assim padrões

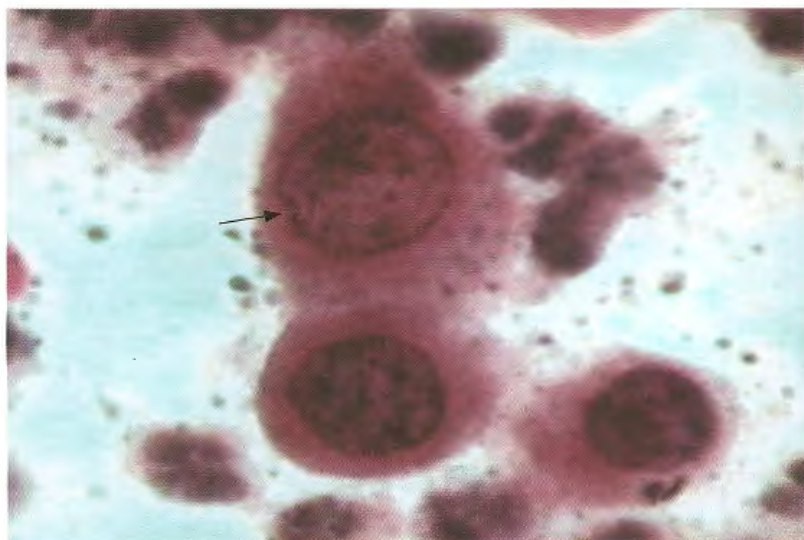



Figura 9.4 – Carcinoma de células escamosas. Foto mostrando células com irregularidades da membrana nuclear (*seta*), com espessamento da margem nuclear e cromatina grosseira irregularmente distribuída. *1.000x*.

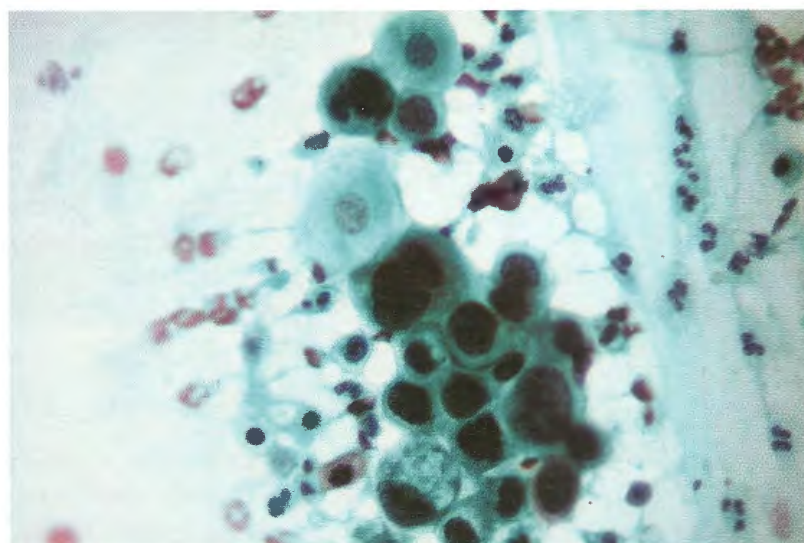



Figura 9.5 – Carcinoma de células escamosas. Observar a relação núcleo/citoplasma aumentada, a irregularidade intensa na membrana nuclear e a hipercromasia nuclear. Algumas células exibem multinucleação. *400x*.

de expressão gênica e contribuindo para o desenvolvimento do câncer[8,17]. Além disso, proteínas da matriz nuclear também poderiam estar alteradas em muitos núcleos malignos, contribuindo para irregularidade da membrana nuclear[17]. São observadas espículas, chanfraduras, dobras anguladas ou formações bizarras (Figura 9.5)[1,12].

A aneuploidia também pode contribuir para a variabilidade nuclear[20]. Entretanto, a causa exata do pleomorfismo nuclear não está totalmente esclarecida. Alguns trabalhos propõem a correlação com instabilidade genética, que ocorreria na parte inicial da carcinogênese, mediante um grande número de mutações genéticas. Assim, as células selecionariam a mutação mais adequada para a progressão tumoral, com formação de clones de células com mutações genéticas específicas. Esses clones estariam relacionados com alterações morfológicas diversas, com consequente desenvolvimento de uma população heterogênea de células com alterações comportamentais características e variação de forma e tamanho nucleares[17].

Hipercromasia

A heterocromatina é densamente hematoxilinofílica, ao passo que a eucromatina é fracamente hematoxilinofílica[1,10]. A coloração da cromatina é geralmente mais escura no câncer. São as proteínas ligadas ao DNA que coram de roxo com a hematoxilina, não o DNA em si; entretanto, a proporção de DNA e proteínas associadas ao DNA em uma célula bem preservada é constante, de forma que o grau de coloração com hematoxilina reflete a quantidade de DNA. Essa hipercromasia indica aumento de proteínas associadas ao DNA e, assim, reflete uma maior quantidade de DNA (ver Figura 9.3)[1]. A hipercromasia pode sugerir o diagnóstico de malignidade; entretanto, como também parece estar presente em determinadas condições benignas decorrentes de processos degenerativos e inflamatórios, é importante associá-la com outros critérios chaves, como irregularidade da membrana nuclear, aumento do tamanho do núcleo e/ou multinucleação[23].

Aumento da relação núcleo/citoplasma

O aumento do volume nuclear em desproporção ao aumento do citoplasma é o responsável pela alteração na relação núcleo/citoplasma, característica importante de malignidade celular. Está relacionado com o aumento do conteúdo de DNA[12]. Uma relação núcleo/citoplasma aumentada é frequentemente observada no câncer (ver Figura 9.3). Entretanto, também pode ser observada nos estágios precursores (por exemplo, nas

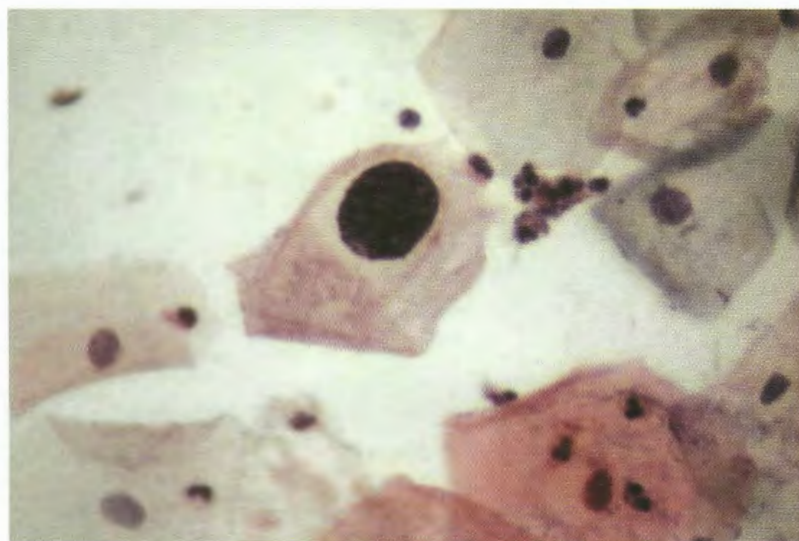



Figura 9.6 – Fotomicrografia mostrando célula escamosa com hipercromasia nuclear e relação núcleo/citoplasma aumentada. Características celulares consistentes com LSIL. *400x*.

978-85-4120-024-0

displasias), durante atividade aumentada, e em pequenos leucócitos normais[1]. A Figura 9.6 mostra aumento na relação núcleo/citoplasma observada em um caso de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL).

Alterações nucleolares

Nucléolo é uma organela do núcleo em interfase que está intimamente relacionada com a síntese de ribossomos[13]. Nos nucléolos, ocorrem o processamento de RNAr e a sua montagem sob a forma de subunidades ribossômicas. O nucléolo não é delimitado por uma membrana; ao contrário, trata-se de um agregado de macromoléculas, incluindo os próprios genes de RNAr, RNAr precursores, RNAr maduros, enzimas associadas ao RNAr, proteínas ribossômicas e ribossomos parcialmente montados[5]. Aparecem como corpos arredondados com tonalidade avermelhada nos esfregaços corados pela coloração de Papanicolaou, uma vez que as proteínas associadas ao RNA são acidófilas, sendo coradas com eosina e *orange* G[1].

A taxa de biogênese dos ribossomos é altamente variável, dependendo da atividade metabólica da célula. Essa taxa está alterada em células com demanda aumentada para síntese de proteínas, representando maior esforço metabólico em células que estão proliferando. Assim, essas células exibem nucléolos maiores quando comparadas com células em repouso[13].

Há muito tempo as alterações nucleolares das células cancerosas estão entre os primeiros aspectos citológicos a atrair a atenção dos patologistas. O primeiro estudo detalhado relacionando nucléolos e câncer foi realizado em 1896, no qual se observaram nucléolos particularmente volumosos em núcleos de células cancerosas[13]. Desde então, alterações na composição, no número, no tamanho, na forma e na atividade dos nucléolos são observadas nas células cancerosas e podem ser usadas para distinguir vários tipos de células tumorais das células normais[19]. Células malignas costumam conter nucléolos aumentados, irregulares e com ângulos pontiagudos[1]. Nucléolos aumentados estão presentes no carcinoma escamoso queratinizante, mas são menos frequentes que nos casos não queratinizantes. Nestes, macronucléolos proeminentes são frequentes (Figura 9.7)[15,16].

O aumento do tamanho dos nucléolos das células cancerosas não pode, entretanto, ser explicado apenas com base no aumento da proliferação celular, já que alguns tumores de crescimento lento podem apresentar grandes nucléolos[8]. Assim, a observação de nucléolos maiores e mais proeminentes nas células tumorais pode refletir não apenas síntese aumentada de ribossomos, mas também mudanças na expressão de proteínas nucleolares envolvidas no controle da diferen-

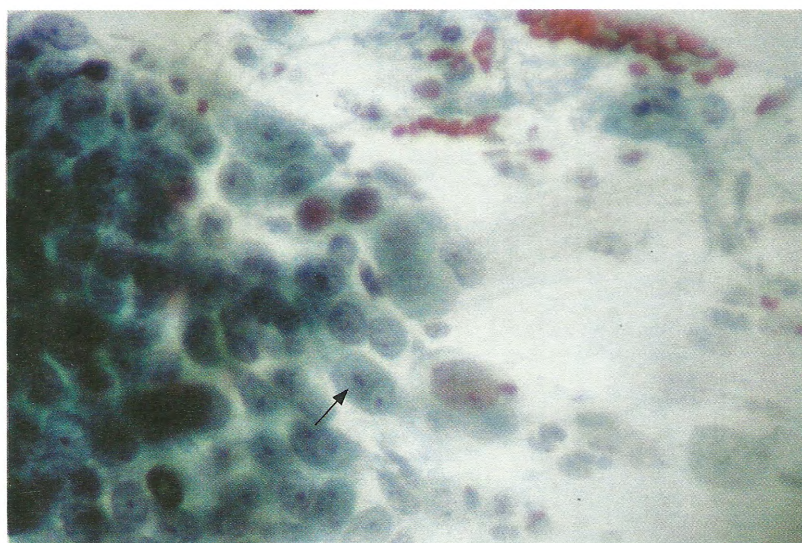



Figura 9.7 – Carcinoma de células escamosas. Agrupamento de células tumorais demonstrando variação no tamanho dos núcleos, cromatina grosseiramente granular e nucléolos proeminentes (*seta*). *400*x.

978-85-4120-024-0

ciação celular e da apoptose. A função nucleolar é influenciada por duas importantes proteínas supressoras de tumor: pRb e p53. Essas proteínas controlam a proliferação celular em mamíferos e impedem a transcrição de genes ribossômicos, por agirem como repressores de transcrição. A função dessas proteínas está frequentemente alterada em cânceres humanos, estando relacionadas com carcinogênese e progressão tumoral, ocasionando a perda do controle da proliferação celular e também aumento da atividade transcricional de RNAr[13,17].

Como a hipertrofia nucleolar é consequência de alterações biológicas nas células cancerosas, responsáveis pela alta agressividade do tumor, o tamanho do nucléolo pode ser um parâmetro útil no prognóstico da doença, uma vez que pode ser determinado de forma fácil, precisa e com baixo custo[13]. Contudo, nucléolos aumentados por si não são bons indicadores de malignidade, já que podem estar presentes em condições de alta produção proteica, como infecções virais, estimulação celular e reparo. Além disso, somente em poucos tipos de lesões o tamanho do nucléolo mostrou ser uma ferramenta segura no diagnóstico diferencial entre tumores benignos e malignos. Entretanto, alterações na forma, como espículas e ângulos pontiagudos, juntamente com aumento do tamanho e da irregularidade dos nucléolos, bem como uma variação extrema no número de nucléolos observados em uma célula multinucleada, constituem bons indicadores de malignidade[1].

Mitoses anormais

A divisão celular começa com a duplicação do conteúdo da célula, seguida da distribuição desse conteúdo para duas células-filhas. O ciclo celular eucariótico é dividido em quatro fases sequenciais: G_1, S, G_2 e M. A interfase é a parte mais longa do ciclo, que inclui a fase de síntese de DNA (fase S) e as fases de intervalo (G_1 e G_2). A fase M compreende dois eventos principais: a mitose (divisão nuclear) e a citocinese (divisão citoplasmática). A mitose é a fase do ciclo celular durante a qual as cromátides-irmãs são separadas e distribuídas a um par de núcleos-filhos idênticos, cada um com sua própria cópia do genoma. É dividida em cinco estágios: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase. Em seguida, ocorre a citocinese, que divide a célula em duas metades, cada uma com um núcleo idêntico. Os cromossomos de quase todas as células eucarióticas tornam-se visíveis ao microscópio óptico durante a mitose (particularmente na metáfase), quando formam espirais e produzem estruturas altamente condensadas[5].

A maioria dos tumores humanos exibe instabilidade genética, com grandes alterações numéricas e estruturais nos cromossomos. Essas alterações geralmente ocorrem concomitantemente, dando origem a anormalidades citogenéticas complexas, observadas particularmente em cânceres de origem epitelial[3]. Células normais entram na mitose com um par de centrossomos, que foram duplicados no início do ciclo celular. O fuso mitótico deve ser bipolar, para que os dois conjuntos de cromátides-irmãs sejam puxados a polos opostos da célula em anáfase[5]. Um número alterado de centrossomos é frequentemente observado no câncer, podendo desencadear a formação de fusos mitóticos multipolares, que resultam em erros na segregação dos cromossomos. Alguns estudos demonstraram que células que expressam as oncoproteínas E6 e E7 do HPV exibem alterações cromossômicas estruturais e numéricas, respectivamente; a proteína E7 do HPV-16 parece induzir erros de duplicação dos centrossomos[3,4].

Mitoses são raramente observadas nos esfregaços citológicos, não tendo a mesma importância a elas reservada em histopatologia[12]. A presença de mitoses por si não caracteriza malignidade, por ser uma característica comum de atividade celular aumentada. Entretanto, a presença de mitoses anormais (tripolar, tetrapolar) é um bom indicador de probabilidade de câncer[1].

Multinucleação

Pode ser resultado de mitoses anormais, multipolares, com falha na citocinese, cujas células sofrem divisão nuclear sem divisão do citoplas-

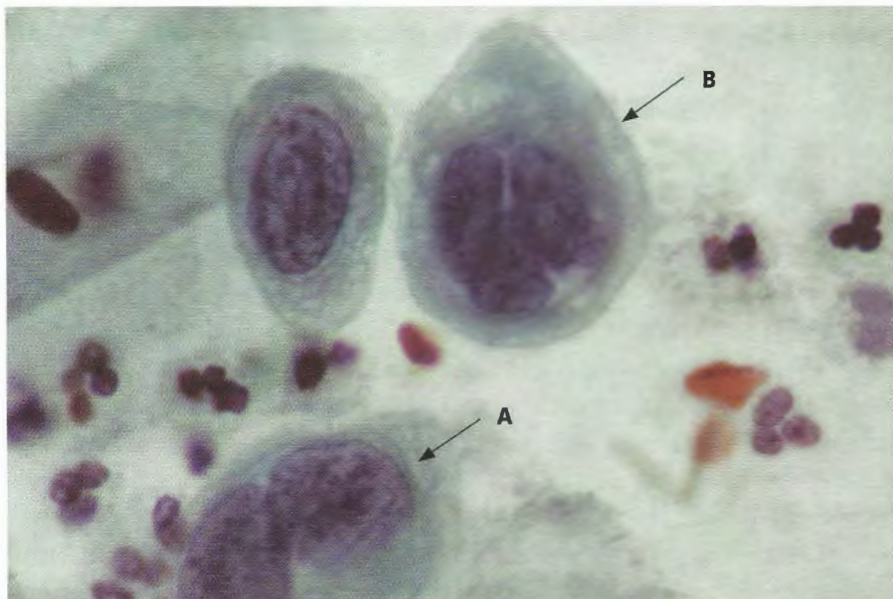



Figura 9.8 – Fotomicrografia mostrando células tumorais binucleada (*A*) e multinucleada (*B*), com relação núcleo/citoplasma aumentada, hipercromasia nuclear e cromatina grosseira irregularmente distribuída. Observar a variação no tamanho e na forma dos núcleos. *1.000*×.

ma[22]. É observada, com frequência, na malignidade, não sendo, entretanto, patognomônica desta, podendo também ser verificada em infecções virais[12]. Casos que mostram pleomorfismo nuclear e características nucleares chaves, como cromatina grosseira irregularmente distribuída, nucléolos em número e forma alterados, hipercromasia, núcleo aumentado e irregularidade na membrana nuclear, podem ser indicativos de malignidade (Figura 9.8)[1].

Pleomorfismo celular e coloração do citoplasma

Pleomorfismo celular define o achado de múltiplas formas celulares, por exemplo, células em fibra, bizarras, em girino, entre outras. O citoplasma das células cancerosas revela remanejamentos pronunciados de tamanho e de forma. As células originadas do carcinoma de células escamosas são geralmente menores que as escamosas normais; elas são redondas, ovaladas, alongadas ou mesmo, às vezes, monstruosas (Figuras 9.9 e 9.10)[12,24]. Entretanto, para que o pleomorfismo celular seja considerado um critério de malignidade, além das formas aberrantes, essas células devem apresentar evidências de malignidade no núcleo[23].

Tumores bem diferenciados, como o carcinoma escamoso queratinizante, apresentam alteração na coloração do citoplasma em decorrência da presença de queratina (queratinização anormal), que deixa o citoplasma com tonalidade alaranjada (orangeofílico). Em geral, a queratinização é um sinal de diferenciação celular. Entretanto, a queratinização no epitélio escamoso não queratinizado do colo uterino representa uma alteração na diferenciação[25]. Em geral, essas células apresentam pleomorfismo, com variações no tamanho e na forma, mostrando células alongadas, fusiformes e caudadas. O citoplasma frequentemente apresenta coloração densa orangeofílica. Hiper e paraqueratose pleomórfica podem estar presentes. É comum a observação de agrupamentos celulares típicos como as pérolas malignas, nas quais as células malignas estão agrupadas, formando o desenho característico de uma rosácea (Figura 9.11). Por conta da queratinização irregular mais pronunciada do citoplasma, ocorre perda ou diminuição da adesão citoplasmática e as células descamam mais facilmente, com maior probabilidade de serem localizadas isoladas no esfregaço citológico. Os casos não queratinizantes exibem células isoladas ou em agregados sinciciais, com margens celulares pouco definidas e citoplasma cianofílico (Figura 9.12)[15,16,23].

Figura 9.9 – Carcinoma de células escamosas mostrando típico pleomorfismo celular, com célula em fibra apresentando queratinização citoplasmática e núcleo denso opaco. *400×*.

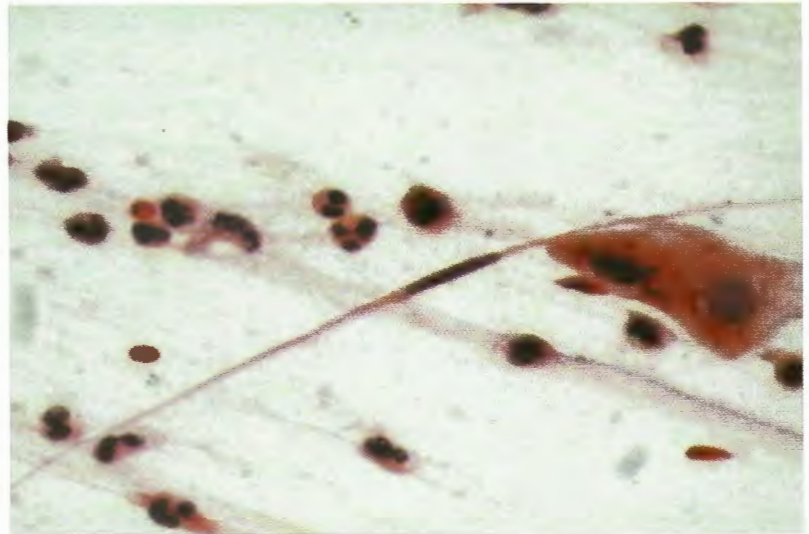



Figura 9.10 – Carcinoma de células escamosas mostrando célula com forma bizarra, caracterizando intenso pleomorfismo celular. Observar os núcleos com irregularidades na forma e cromatina grosseiramente granular. *400×*.

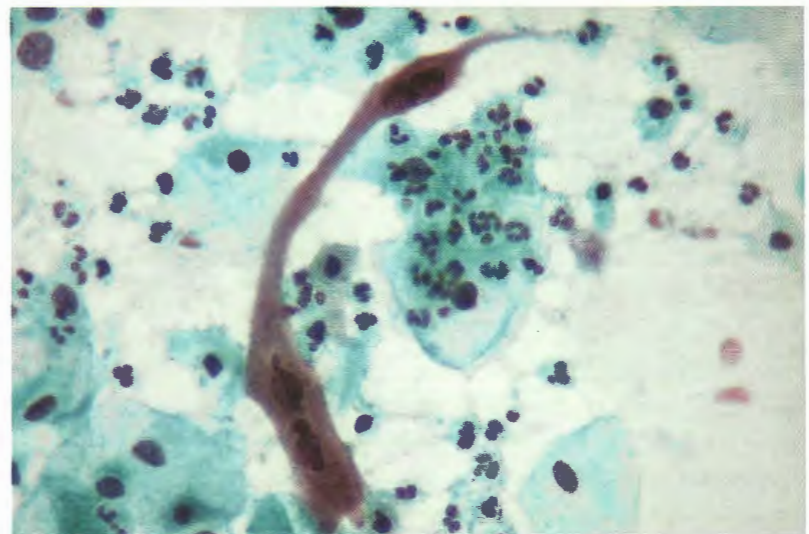



Figura 9.11 – Fotomicrografia mostrando agrupamento celular típico em forma de pérola maligna (*seta*). *400×*.

978-85-4120-024-0

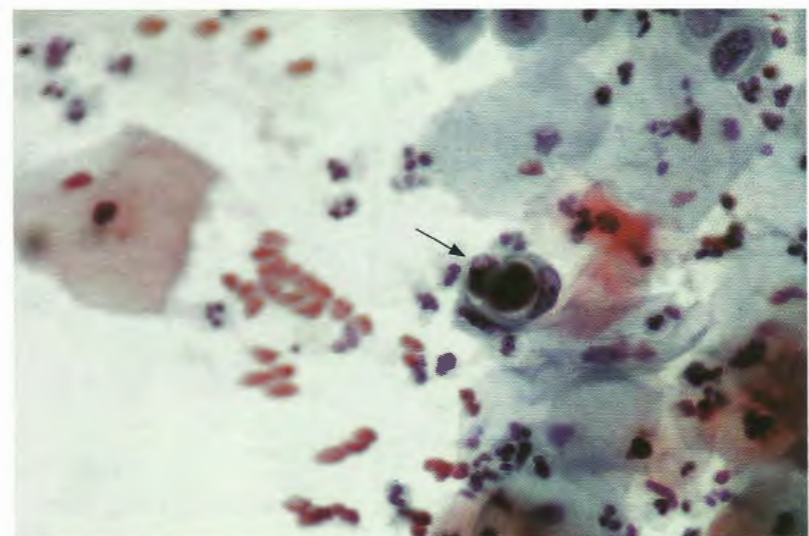
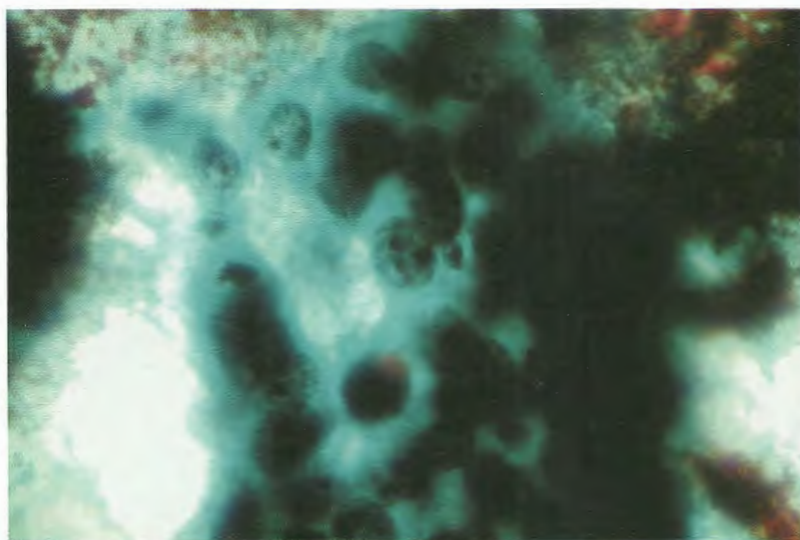



Figura 9.12 – Carcinoma de células escamosas. Agregado sincicial de células tumorais com margens celulares pouco definidas. Núcleos redondos a ovais com cromatina grosseiramente granular, irregularmente distribuída e nucléolos proeminentes. Observar a intensa diátese tumoral no fundo. *400x*.

Diátese tumoral

A capacidade de invasão de tecidos distantes (metástase) é um fenômeno importante relacionado com a malignidade. Para uma célula cancerosa formar metástase, ela deve se livrar dos freios que controlam a célula normal. O potencial de disseminação pode ser observado normalmente em alguns tipos de células adultas, como os leucócitos. No desenvolvimento normal das células epiteliais, os genes envolvidos com o processo de invasão e metástase estão reprimidos. Apesar de os mecanismos moleculares não serem bem entendidos, alguns trabalhos propõem que, no câncer, a repressão poderia ser perdida por mutações incapacitantes nos genes repressores, levando assim ao surgimento do comportamento invasivo e metastático. Além disso, moléculas de adesão associadas à membrana celular podem ter sua expressão alterada no câncer, o que levaria à capacidade de deslocamento de células e metástase[5,20].

No carcinoma de células escamosas cervical, pode haver invasão de estruturas adjacentes, bem como metástases distantes via sistema linfático, e, menos frequentemente, via corrente sanguínea[1]. Na presença de carcinoma invasivo, ocorre uma reação estromal, possibilitando a observação

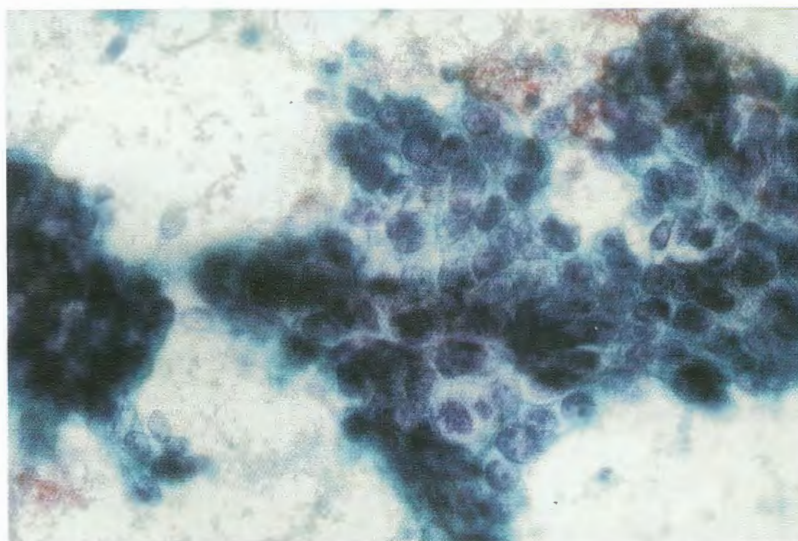
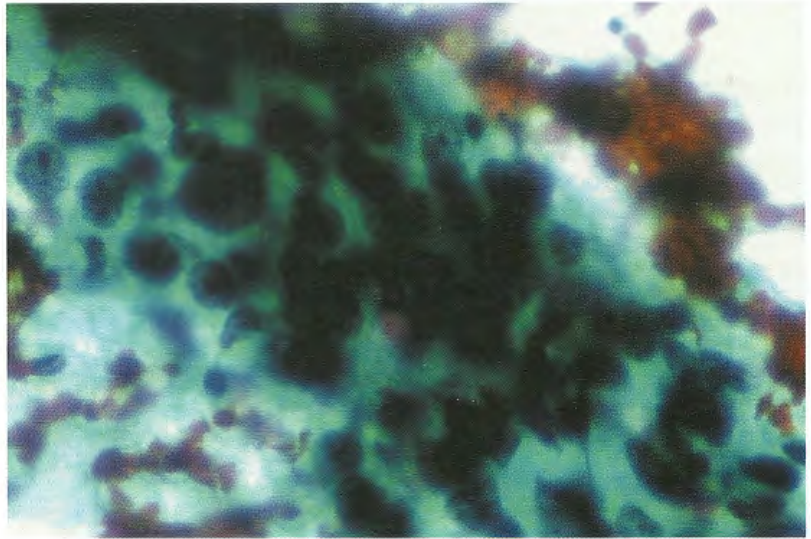



Figura 9.13 – Fotomicrografia mostrando agrupamento de células derivadas de adenocarcinoma apresentando núcleos aumentados, com sobreposição, hipercromasia e cromatina grosseira com distribuição irregular. Presença de diátese tumoral no fundo. *400x*.

Figura 9.14 – Carcinoma de células escamosas. Células em agrupamento sincicial com margens celulares indistintas. Núcleos exibindo variação marcada na forma e no tamanho, com cromatina grosseiramente granular, irregularmente distribuída e macronucléolos. Observar a proeminente diátese tumoral. *400×*.

978-85-4120-024-0

de alterações no esfregaço citológico. Essa alteração é denominada diátese tumoral, caracterizada pela presença de um precipitado proteináceo granular, eosinofílico ou cianofílico, no fundo do esfregaço, que representa exsudato inflamatório e necrose das células tumorais. Além disso, observam-se também pigmento de sangue degenerado resultante de hemólise, leucócitos em degeneração e fragmentos celulares, especialmente nos adenocarcinomas do endométrio e da endocérvice (Figura 9.13). A diátese tumoral pode estar presente em uma distribuição uniformemente difusa ou localizada. Os casos de carcinoma de células escamosas invasivo não queratinizante quase sempre contêm evidência de necrose na forma de diátese tumoral (Figura 9.14). Os casos queratinizantes não estão comumente associados a diátese tumoral, em razão do crescimento exofítico[15,16,23,25].

Fragmento tecidual verdadeiro

O achado de fragmento tecidual verdadeiro, por si, não é critério de malignidade. Entretanto, quando bem preservado, onde as células aparentemente cresceram juntas e se fragmentaram como uma unidade, é possível avaliar a presença de malignidade mediante a comparação célula a célula de características nucleares chaves, além da relação núcleo/citoplasma aumentada e da sobreposição nuclear. Adenocarcinoma bem diferenciado e em *in situ* tendem a descamar células em camadas e em fragmentos teciduais[1].

Agrupamentos celulares

As células malignas apresentam modificações em suas membranas que conduzem à perda de coesividade celular e à consequente descamação de células isoladas; assim, o achado de células neoplásicas isoladas é um importante sinal citológico de malignidade[12]. Entretanto, em alguns casos, as células podem ocorrer em camadas bidimensionais ou agrupamentos tridimensionais, bem como em agregados sinciciais[16].

Nos agregados sinciciais, as células estão desorganizadas e distribuídas irregularmente, com margens celulares indistintas e sobreposição nuclear (Figuras 9.12 e 9.14). A presença desses agregados pode indicar maturação reduzida e reflexo da falta de diferenciação das células epiteliais. Agrupamentos sinciciais são mais comumente observados em carcinoma *in situ* e câncer invasivo[1].

É possível observar intensa variação no tamanho dos núcleos e das células presentes nos agrupamentos celulares de processos malignos, sempre ressaltando a presença de outros critérios chaves, como hipercromasia, irregularidades da membrana nuclear e distribuição irregular da cromatina[23].

Células com inclusão

A presença de células contendo inclusões citoplasmáticas é possível em determinadas situações, estando relacionada com a propriedade fagocitária aumentada das células malignas, onde se observa uma célula maligna englobando outra célula também maligna, em um fenômeno descrito como canibalismo[23].

Vacúolos citoplasmáticos

A presença de vacúolos citoplasmáticos anormais pode ser indicativa de malignidade, uma vez que é observada em alguns tipos de câncer, como nos adenocarcinomas. Vacúolos de tamanhos variados são frequentemente vistos no citoplasma empurrando o núcleo para a periferia celular; há casos em que um grande e único vacúolo empurra o núcleo para a periferia do citoplasma, dando à célula o aspecto de um anel de sinete. Células em sinete também podem ser observadas em algumas condições benignas, devendo-se observar as características nucleares para o diagnóstico diferencial[23,24].

Critérios indiretos

Existem outros sinais que indiretamente podem estar relacionados com a malignidade, como o desvio do índice de maturação celular para a direita, indicando maior atividade estrogênica, a presença de hemácias, leucócitos e células endometriais, particularmente fora do período menstrual ou na pós-menopausa[12].

As hemácias e os leucócitos geralmente estão presentes em grande número nos esfregaços citológicos de pacientes com câncer, porém em lesões pré-cancerosas não são observados com frequência. Os histiócitos, por sua vez, também poderão estar presentes em condições benignas e malignas; no entanto, a presença de histiócitos gigantes multinucleados em pacientes que não estão na menopausa e na pós-menopausa tem grande significado como alerta para malignidade[23].

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não existe um critério citológico de malignidade único e absoluto que possa ser utilizado para o diagnóstico de câncer. Entretanto, a ocorrência concomitante de mudanças morfológicas chaves leva à significativa probabilidade de o câncer estar presente. A maior parte dessas características morfológicas válidas para diagnóstico do câncer está presente no núcleo da célula.

O conhecimento sobre a morfologia e a organização da maquinaria regulatória genética da célula cancerosa pode auxiliar no entendimento da patologia do núcleo maligno, no diagnóstico do câncer e no planejamento de drogas para o tratamento do câncer.

AGRADECIMENTOS

À Msc. Mary M. T. Irie, Farmacêutica-Bioquímica, responsável pelo Laboratório de Citologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá, PR, por sua valiosa contribuição na preparação e na seleção das fotomicrografias.

Referências

1. BIBBO, M. **Comprehensive Cytopathology**. New York: Saunders, 1997. p. 1122.
2. PEZO, R. C.; SINGER, R. H. Nuclear microenvironments in cancer diagnosis and treatment. **J. Cell Biochem.**, v. 104, p. 1953-1963, 2008.
3. DUENSING, S.; MÜNGER, K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. **Cancer Res.**, v. 62, p. 7075-7082, 2002.
4. DUENSING, S.; MÜNGER, K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. **Int. J. Cancer**, v. 109, p. 157-162, 2004.
5. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 1396.
6. NICKERSON, J. A. Nuclear dreams: the malignant alteration of nuclear architecture. **J. Cell Biochem.**, v. 70, p. 172-180, 1998.
7. SHADEO, A.; CHARI, R.; LONERGAN, K. M. et al. Up regulation in gene expression of chromatin remodeling factors in cervical intraepithelial neoplasia. **BMC Genomics**, v. 9, p. 64, 2008.

8. ZINK, D.; FISCHER, A. H.; NICKERSON, J. A. Nuclear structure in cancer cells. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 677-687, 2004.
9. DEY, P. Chromatin pattern alteration in malignant cells: an enigma. **Diagn. Cytopathol.**, v. 32, p. 25-30, 2005.
10. TRUE, L. D.; JORDAN, C. D. The cancer nuclear microenvironment: interface between light microscopic cytology and molecular phenotype. **J. Cell Biochem.**, v. 104, p. 1994-2003; 2008.
11. DUEÑAS-GONZÁLEZ, A.; LIZANO, M.; CANDELARIA, M. et al. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. **Mol. Cancer**, v. 4, p. 38, 2005.
12. LIMA, G. R.; GEBRIM, L. H.; OLIVEIRA, V. C. et al. **Ginecologia Oncológica**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 544.
13. DERENZINI, M.; MONTANARO, L.; TRERÉ, D. What the nucleolus says to a tumour pathologist. **Histopathology**, v. 54, p. 753-762, 2009.
14. O'BRIEN, T. P.; BULT, C. J.; CREMER, C. et al. Genome function and nuclear architecture: from gene expression to nanoscience. **Genome Res.**, v. 13, p. 1029-1041, 2003.
15. BONFIGLIO, T. A.; EROZAN, Y. S. **Gynecologic Cytopathology**. New York: Lippincott-Raven, 1997. p. 220.
16. SOLOMON, D.; NAYAR, R. **Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal – Definições, Critérios e Notas Explicativas**. 2. ed., Rio de Janeiro: Revinter, 2005. p. 192.
17. DEY, P. Cancer nucleus: morphology and beyond. **Diagn. Cytopathol.**, v. 38, p. 382-390, 2009.
18. HE, S.; DUNN, K. L.; ESPINO, P. S. et al. Chromatin organization and nuclear microenvironments in cancer cells. **J. Cell Biochem.**, v. 104, p. 2004-2015, 2008.
19. ZAIDI, S. K.; YOUNG, D. W.; JAVED, A. et al. Nuclear microenvironments in biological control and cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, p. 454-463, 2007.
20. BIGNOLD, L. P. The mutator phenotype theory of carcinogenesis and the complex histopathology of tumours: support for the theory from the independent occurrence of nuclear abnormality, loss of specialization and invasiveness among occasional neoplastic lesions. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 60, p. 883-891, 2003.
21. NICKERSON, J. A. Experimental observations of a nuclear matrix. **J. Cell Sci.**, v. 114, p. 463-474, 2001.
22. GANEM, N. J.; GODINHO, S. A.; PELLMAN, D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. **Nature**, v. 460, p. 278-282, 2009.
23. CARVALHO, G. Critérios de malignidade aplicados às células do trato genital feminino. In: ________. **Citologia do Trato Genital Feminino**. 4. ed., São Paulo: Atheneu, 2002, p. 157-165. Cap. 17.
24. KOSS, L. G.; GOMPEL, C. **Introdução à Citopatologia Ginecológica com Correlações Histológicas e Clínicas**. São Paulo: Roca, 2006. p. 216.
25. SCHNEIDER, M. L.; SCHNEIDER, V. **Atlas Diagnóstico Diferencial em Citologia Ginecológica**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. p. 165.

Capítulo 10

Evolução das Classificações para Diagnóstico Citológico

Luiz Carlos Zeferino
Silvia Helena Rabelo dos Santos
Maria Cristina do Amaral Westin

INTRODUÇÃO

A constatação de um caso de câncer com origem no colo uterino data de 1877, descrita por Ruge e Veit. Em 1908, Schauenstein verificou que se tratava de um padrão canceroso que se desenvolvia a partir da superfície. Em 1910, Rubin considerou como câncer incipiente a transformação neoplásica confinada à extensão do epitélio. Em 1912, Schottländer e Kermauner utilizaram o termo carcinoma *in situ* para designar as alterações que ocorrem no epitélio adjacente ao carcinoma cervical invasor. Contudo, o termo carcinoma *in situ* foi mais precisamente definido pelo patologista, Albert C. Broders, em seu manuscrito de 1932[1,2]. Várias designações foram utilizadas para as lesões não invasoras, como carcinoma pré-invasivo, carcinoma intraepitelial, epitélio pré-canceroso, doença de Bowen da cérvice e carcinoma epidermoide sem evidência de invasão[2].

Em 1925, um ginecologista alemão, Hinselmann, verificou que, a olho nu, era muito difícil detectar as alterações inconspícuas do epitélio cervical causadas por um câncer em seu estado inicial e criou um instrumento, o colposcópio, que aumentava as imagens cervicais em até 20 vezes. Esse pesquisador incrementou a investigação colposcópica com biópsias cervicais, mas teve muita dificuldade em convencer os conservadores patologistas alemães de que as lesões precursoras detectadas pela colposcopia eram malignas[2]. Em 1920 e 1930, dois patologistas alemães, Walter Schiller e Robert Meyer, escreveram extensivamente sobre a interpretação das biópsias cervicais e concluíram que as lesões intraepiteliais pré-cancerosas eram, de fato,

precursoras do câncer cervical e que poderiam ser identificadas pela microscopia[2].

A introdução da citologia cérvico-vaginal como um meio de detecção de lesões precursoras cervicais foi um marco no estudo do câncer do colo uterino. Com base em publicações científicas, o primeiro pesquisador a sugerir a coleta direta de material do colo uterino para o diagnóstico de câncer foi Aureli Babés, patologista romeno, em artigo publicado na "Presse Médicale", em 11 de abril de 1928. Ainda nesse artigo, há referência de uma comunicação feita à Sociedade de Ginecologia de Bucareste em 1927[3]. Mesmo considerando a época da publicação, vários conceitos abordados são muito atuais, como o fato de as anormalidades de células epiteliais, particularmente no caso de câncer da cérvice uterina, precederem o aparecimento de invasão. Também é importante destacar que esse autor descreve minuciosamente a técnica de coleta utilizando alça de platina, inclusive ressaltando a fixação com álcool metílico e a coloração pelo método de Giemsa. São descritas, com detalhes, anormalidades referentes aos arranjos das células epiteliais e atipias nucleares, conceitos esses ainda aplicáveis atualmente.

Há referências de que George Papanicolaou, médico grego que atuou profissionalmente nos EUA, tenha apresentado um trabalho sobre a possibilidade de se detectar células tumorais em secreções vaginais, durante a Terceira Conferência Melhoria da Raça, em Michigan, em 1928[4]. Todavia, a possibilidade de se fazer diagnóstico de carcinoma do colo uterino mediante células atípicas presentes em esfregaços foi publicada por Papanicolaou e Traut somente em 1941, no American Journal of Obstetrics and Gynecology[5]. É importante salientar que esse artigo faz referência ao fato de Papanicolaou ter se dedicado ao estudo das variações normais e anormais do esfregaço vaginal em mulheres e animais desde 1923. Ele observou que os carcinomas do fundo de saco posterior e da cérvice são lesões esfoliativas, e que essas células esfoliadas poderiam ser verificadas na vagina.

Com base nessa observação, Papanicolaou orientou a coleta de material com uma pipeta de vidro acoplada a um dispositivo de sucção. Essa pipeta era introduzida no fórnix posterior da vagina e o aspirado vaginal era distribuído sobre a superfície de uma lâmina de vidro e fixado com uma mistura equivalente de álcool a 95% e éter. Orientações sobre a importância e o tempo de fixação são detalhadas nesse artigo; o método de coloração indicado é de outra publicação de Papanicolaou, datada de 1942. Em seguida, Papanicolaou descreveu características citológicas referentes a arranjos de células epiteliais e atipias nucleares e citoplasmáticas. Essas publicações e a divulgação desses achados por Papanicolaou levaram à proliferação de laboratórios de citopatologia a partir do final da década de 1940. Em 1954, Papanicolaou e Traut editaram um atlas ilustrando as células atípicas presentes no esfregaço cérvico-vaginal. Há relatos de que George Papanicolaou foi várias vezes indicado para o Prêmio Nobel de Medicina, porém não o teria ganhado por não ter mencionado Aureli Babés em seus artigos. Wied[6] argumentou que o grande benefício para a humanidade não foi promovido por quem publicou primeiro, mas por quem estimulou a introdução de programas de rastreamento que beneficiaram milhões de mulheres. Nesse sentido, George Papanicolaou deixou marca permanente e de relevância singular como poucos cientistas o fizeram até hoje.

Ainda assim, há opiniões diversas acerca da questão do idealizador do exame citológico. Diamantis *et al.*[7] argumentam que há necessidade de se fazer uma comparação cuidadosa entre os métodos desenvolvidos por Aureli Babés e George Papanicolaou. Segundo esse autores, embora o objetivo final de ambos os métodos tenha sido o diagnóstico do câncer cervical, há diferenças significativas no que se refere ao conceito e ao modelo. Esses autores afirmam que o método desenvolvido por Papanicolaou era novidade em todos os seus aspectos: amostragem, fixação e coloração. Por outro lado, o método desenvolvido por Aureli Babés não era uma novidade em sua época. Eles argumentam, ainda, que o método não abrasivo desenvolvido por Papanicolaou seria o único que poderia ser aplicado como um teste de triagem para o câncer

cervical. Por outro lado, Naylor *et al.*[8] assinalam que Aureli Babés, em associação com Constantin Daniel, publicou a maior contribuição à citologia em 1928, ocupando atualmente uma posição pouco importante na História.

O rastreamento do câncer do colo uterino mediante exame citológico estendeu-se para o mundo todo. Na literatura científica, há dados sobre rastreamento sistemático do câncer do colo uterino a partir de 1949, quando foi implantado na Província de Colúmbia Britânica, Canadá[9]. Os médicos ginecologistas entusiasmaram-se com a possibilidade de controle do câncer do colo do útero. Foi o médico canadense, J. Ernest Ayre, que, em meados de 1940, instituiu o método que é hoje conhecido como método de Papanicolaou, fazendo uso de uma espátula, chamada então de espátula de Ayre, a fim de obter raspados diretamente da cérvice uterina, e não uma coleção de secreções fáceis de serem obtidas, mas tediosas, a serem aplicadas como rastreamento[10].

EVOLUÇÃO DAS CLASSIFICAÇÕES

Desde a introdução do exame citológico do epitélio do colo uterino, várias classificações foram propostas, representando o conhecimento que se tinha desse carcinoma e de suas lesões precursoras. A classificação de Papanicolaou, transcrita em algarismos romanos de I a V, referia-se genericamente à citologia esfoliativa de qualquer órgão e não mencionava a existência da fase intraepitelial do carcinoma do colo uterino, pois classificava o esfregaço de acordo com a probabilidade de ser ou não câncer. Considerava como classe III, citologia sugestiva, porém não conclusiva, para malignidade. Como classe IV, citologia fortemente sugestiva de malignidade e como classe V, citologia conclusiva para malignidade[11].

Uma das denominações mais conhecidas das atipias celulares intraepiteliais foi "displasia", termo introduzido por Papanicolaou em 1949, para uso em histopatologia. Do ponto de vista clínico, a displasia era considerada de prognóstico incerto e era pouco valorizada, resultando que, por muitos anos, não se recomendava seu tratamento. Em 1953, Reagan *et al.*[12] recomendaram o uso do termo displasia para lesões menos graves do que o carcinoma *in situ*. Ainda nesse artigo, esses autores sugeriram que, se deixada sem tratamento, a maioria dessas lesões regrediria ou permaneceria inalterada por muito tempo. Em contrapartida, o carcinoma *in situ* do colo uterino já era considerado precursor necessário de um carcinoma invasivo, sendo a histerectomia o tratamento preconizado. Em 1961, no Primeiro Congresso Internacional de Citologia realizado em Viena, definiu-se que os termos para designar citologicamente as lesões cervicais eram: carcinoma invasor, carcinoma *in situ* e displasias; a última deveria ser graduada como leve, moderada e grave. Contudo, a reprodutibilidade e a concordância entre os diagnósticos de displasia grave e carcinoma *in situ* eram muito pequenas. Além disso, alguns clínicos acreditavam que displasias e carcinoma *in situ* eram duas lesões biologicamente distintas e independentes, com potencial maligno restrito aos carcinomas *in situ*, não exigindo tratamento as lesões displásicas.

Estudos de Richart e Barron[13] demonstraram que as displasias poderiam progredir para carcinoma invasivo. Na sequência, estudos de ploidia demonstraram que as displasias e o carcinoma *in situ* estavam muito relacionados. Essas observações serviram de base para que Richart propusesse outra classificação, a de NIC[14]. Fundiu-se, em uma única categoria, a displasia grave e o carcinoma *in situ*, classificação essa que ficou com três graus, forma ainda hoje utilizada para os diagnósticos histopatológicos[15], sendo também, eventualmente, utilizada para o diagnóstico citológico. Na prática, as lesões inicialmente identificadas como displasias passaram a ser clinicamente mais valorizadas.

Laboratórios de citologia criaram suas próprias adaptações da classificação de Papanicolaou para relatar displasias. Consequentemente, não havia uniformidade entre essas classificações, o que resultou em confusão na indicação de conduta clínica para as pacientes pelos profissionais responsáveis. De fato, uma pesquisa realizada entre patologistas, citotécnicos e clínicos demonstrou que 72% dos laboratórios entrevistados utilizavam

a classificação de Papanicolaou, mas havia falta de concordância significativa na correlação entre as classes. Por exemplo, displasia leve foi considerada classe II na classificação de Papanicolaou por 56% dos citotécnicos, 58% dos patologistas e 65% dos clínicos. Disparidades semelhantes foram observadas para a displasia grave, que foi considerada como classe IV por 33% dos citotécnicos, 25% dos patologistas e 19% dos clínicos[16]. Relatórios descritivos utilizando a terminologia de NIC tornaram-se mais frequentes[16, 17,18].

Sistema de Bethesda

No final da década de 1980, já se atribuía ao HPV um papel importante na carcinogênese do epitélio do colo uterino e reconhecia-se que a maioria das lesões intraepiteliais regredia espontaneamente. Sabia-se também que o exame citológico possuía baixa reprodutibilidade e que a concordância com o diagnóstico histológico não era absoluta. O conhecimento acumulado indicava que as células escamosas e as glandulares presentes no esfregaço deveriam ser analisadas separadamente e que, com frequência, não era possível estabelecer um diagnóstico citológico conclusivo ou que tivesse alguma correlação histológica mais definida.

Tais fatos não seriam problemas ou limitações importantes do exame citológico, desde que esse procedimento fosse considerado um rastreador de casos suspeitos, deixando a definição do diagnóstico final para o exame histopatológico. Independentemente da necessidade, porém, de melhorar a qualidade do exame citológico, nos EUA, era importante dar mais precisão à terminologia diagnóstica. Em 1988, um grupo multidisciplinar de profissionais de saúde envolvidos com o câncer cervical reuniu-se em um grupo de trabalho patrocinado pelo Instituto Nacional do Câncer, na cidade de Bethesda, nos EUA, para considerar os benefícios da padronização nos laudos fornecidos pelos laboratórios de citologia e para propor uma terminologia diagnóstica uniforme que facilitasse a comunicação entre o laboratório e o clínico. O grupo de trabalho acordou, por unanimidade, que a classificação de Papanicolaou modificada por Reagan já não era apropriada para a prática do diagnóstico citológico. Ele também considerou que o uso da terminologia de NIC não era apropriada pela baixa reprodutibilidade entre os graus. Os participantes desse grupo elaboraram um sistema de classificação para as lesões epiteliais cervicais, o qual veio a ser conhecido como sistema de Bethesda.

Uma contribuição importante do sistema de Bethesda foi a introdução dos diagnósticos que expressam as dúvidas dos citologistas. Trata-se de um diagnóstico citológico sem o diagnóstico histopatológico correspondente. O diagnóstico de ASC-US era utilizado para designar anormalidades celulares mais marcadas do que as atribuídas às alterações reativas, mas que, quantitativa ou qualitativamente, não permitiam um diagnóstico de lesão intraepitelial escamosa. ASC-US não deveria ser utilizado como sinônimo de termos anteriormente utilizados, como atipia, atipia benigna, atipia inflamatória ou reativa. Esses termos eram, e ainda são, designados pelo sistema de Bethesda como alterações celulares reativas. O novo termo ASC-US começou a ganhar aceitação crescente entre os laboratórios. O levantamento realizado pelo Colégio Americano de Patologistas, em 1990, constatou que 82,5% dos laboratórios limitavam o uso do termo "atipia" para anormalidades celulares de significado indeterminado e que a taxa média de ASC-US era de 2,9%, com apenas 10% dos laboratórios com taxas de ASC-US superiores a 9%[16]. Para as células escamosas, a designação de NIC parecia muito agressiva, tendo em vista o alto percentual de regressão. Assim, o sistema de Bethesda passou a denominá-la lesão intraepitelial escamosa (em inglês, SIL). Essa nova nomenclatura foi subdivida em apenas duas categorias, de baixo e de alto graus, retratando diferentes potenciais evolutivos dessas lesões. As LSIL correspondiam às alterações celulares associadas ao efeito citopático do HPV, lesões previamente classificadas como displasia leve, NIC I e condiloma plano. As HSIL referiam-se às lesões classificadas previamente como displasia moderada, displasia grave, carcinoma *in situ*, NIC II e NIC III.

É interessante destacar que a classificação de displasia continha quatro categorias de lesão intraepitelial e a classificação de NIC, três. Já o sistema de Bethesda subdividiu as lesões escamosas em apenas duas categorias. Do ponto de vista de conduta clínica, não havia razão evidente para subdividir essas lesões em três ou quatro categorias. Nesse sentido, o sistema de Bethesda correspondia à conduta clínica mais frequentemente adotada, que é mais conservadora para as lesões consideradas de baixo grau e mais intervencionista para as lesões consideradas de alto grau[19]. Essa sistematização de Bethesda promoveu maior concordância do diagnóstico citológico entre os observadores, admitindo-se que classificar uma lesão em duas categorias resulta em menor variabilidade do que em três ou quatro. Isso minimiza o aspecto subjetivo da avaliação, que é uma limitação inerente ao método.

Três anos após a publicação inicial do sistema de Bethesda, em 1991, o Instituto Nacional do Câncer dos EUA patrocinou um segundo encontro de trabalho para avaliar o uso desse sistema na prática e para considerar áreas que necessitavam ser melhoradas. Uma questão importante identificada pelos participantes do seminário foi a falta de critérios morfológicos uniformes para termos diagnósticos específicos utilizados pelo sistema de Bethesda, incluindo o diagnóstico de ASC-US. Nesse grupo de trabalho, também houve a recomendação para que se qualificassem as células escamosas atípicas de significado indeterminado como provavelmente reativas ou que se indicasse a possibilidade de lesão de baixo e de alto graus ou mesmo lesões mais avançadas. Contudo, a maioria dos diagnósticos de ASC-US era liberada sem esses qualificadores. O primeiro atlas do sistema de Bethesda foi publicado em 1994. Critérios, fotografias e notas explicativas foram fornecidos para todos os tipos de diagnóstico, incluindo ASC-US e suas qualificações. Nessa publicação, usou-se a sigla ASC-US. Nenhuma mudança foi efetuada em relação ao diagnóstico de lesão intraepitelial escamosa[19].

Um terceiro encontro de trabalho foi realizado em 2001, quando a minoria de participantes sugeriu a eliminação da categoria de ASC-US. No entanto, os integrantes do grupo decidiram que era essencial manter essa categoria porque uma parte substancial de lesões dos tipos NIC II e NIC III é diagnosticada após uma diagnose de ASC-US. Estimativas sugerem que 10 a 20% das mulheres com ASC-US tenham NIC II ou III subjacente e que 1 em 1.000 possa ter câncer invasivo[20].

Nessa oficina, o sistema de Bethesda definiu que as ASC seriam classificadas em duas categorias: a primeira corresponde a células escamosas atípicas de significado indeterminado, sendo identificada pela sigla ASC-US; a segunda corresponde a células escamosas atípicas, não podendo excluir a ASC-H[20]. Assim, ASC refere-se às anormalidades celulares sugestivas de SIL, mas que não são quantitativa ou qualitativamente suficientes para tal diagnóstico. O diagnóstico de ASC-US refere-se às mudanças celulares sugestivas de LSIL ou SIL de grau indeterminado. Embora a maioria das interpretações de ASC-US seja sugestiva de LSIL, a denominação *significado indeterminado* é utilizada porque 10 a 20% das mulheres com esse diagnóstico têm NIC II ou NIC III subjacente. ASC-H refere-se a alterações celulares sugestivas de HSIL. Casos classificados como ASC-H estão associados a maior valor preditivo para detecção de NIC II ou NIC III subjacente[20].

Na revisão de 2001, houve argumentação de que algumas lesões do tipo NIC II, assim como a maioria de lesões NIC I, não deveriam ser consideradas verdadeiras fases precursoras do câncer do colo do útero, mas sim o efeito citopatopático de uma infecção viral produtiva. Por conseguinte, foi alegado que a divisão entre as SIL deveria ser feita entre NIC II e NIC III, e não entre NIC I e NIC II. De fato, há evidências de que a história natural da NIC II seja mais próxima à da NIC I do que a da NIC III. Uma extensa revisão da literatura, abrangendo os estudos publicados entre 1950 e 1992, mostrou que 43% das lesões NIC II regridem espontaneamente e 35% persistem. Em comparação, 57% das NIC I e 32% das lesões NIC III regridem espontaneamente, ao passo que 32 e 56%

das lesões tratadas NIC I e NIC III, respectivamente, persistem[21]. O padrão da prevalência da NIC II é diferente do da NIC III e semelhante ao da NIC I. A média de idade no momento do diagnóstico de NIC II é cerca de 10 anos mais jovem que a média de idade no momento do diagnóstico de NIC III. Contudo, a distinção citológica entre NIC II e NIC III é menos reprodutível do que entre NIC I e NIC II, sem nenhuma mudança efetuada nesse sentido. Outra inovação foi a inclusão na categoria de HSIL de casos com alguma suspeita de invasão, desde que se qualifiquem como tal[22]. Houve também maior detalhamento nas características citológicas de padrão de células de HSIL envolvendo glândulas endocervicais, que é um dos principais diagnósticos diferenciais de células glandulares atípicas[23].

Os critérios citomorfológicos para o diagnóstico de SIL são relativamente bem definidos, no entanto há variabilidade considerável interobservadores e discrepância entre os diagnósticos citopatológico e histopatológico. Mesmo considerando duas categorias de SIL, existe uma taxa de discordância interobservadores de 10 a 15% entre os diagnósticos de LSIL e HSIL[23]. Quando o sistema de Bethesda foi redigido em 1988, a conduta clínica nos EUA era focada em identificar todas as lesões intraepiteliais escamosas, incluindo as de baixo grau (LSIL), com base na opinião de que todos os graus de lesão representavam lesões precursoras e que necessitavam de colposcopia e tratamento. No entanto, atualmente tem havido uma mudança em relação a condutas clínicas com base no reconhecimento de que LSIL, principalmente em mulheres jovens, representam infecções autolimitadas por HPV[22]. Assim, a ênfase atual é na detecção e no tratamento de lesões de alto grau histologicamente confirmadas, em particular as NIC III.

O sistema de Bethesda inovou também ao incluir diagnóstico citológico para as células glandulares. É fato que vinha sendo observado o aumento da incidência de adenocarcinomas e seus precursores em mulheres em idade reprodutiva, mesmo em países onde o rastreamento citológico está bem estabelecido. A análise e a descrição da qualidade do esfregaço no laudo citológico valorizaram a representação das células endocervicais nos esfregaços cérvico-vaginais, o que resultou em melhor entendimento na epidemiologia dos adenocarcinomas cervicais[24,25,26,27]. O diagnóstico de células glandulares atípicas de significado indeterminado referia-se a anormalidades além das observadas em alterações reativas ou reparativas, mas insuficientes para o diagnóstico de adenocarcinoma invasivo. Na revisão de 1991, houve também a orientação para que se qualificasse o diagnóstico de células glandulares atípicas de significado indeterminado como provavelmente reativo ou provavelmente neoplásico. A sigla AGUS também apareceu no livro publicado em 1994.

Na revisão de 2001, o diagnóstico de AGUS foi refeito para o de AGC, com o objetivo de evitar confusão com o diagnóstico de ASC-US, uma vez que o risco de lesão de alto grau do colo uterino é muito maior em mulheres com AGC. De fato, estudos demonstram que 9 a 38% das mulheres com AGC possuem lesão clinicamente importante (NIC II, NIC III, adenocarcinoma *in situ* e câncer) e 3 a 17%, carcinomas invasivos[28].

Sempre que possível, a origem das células glandulares atípicas deve ser indicada[29], uma vez que a abordagem clínica é diferente. Células glandulares endometriais atípicas representam 5% de todos os casos de AGC, e um terço das mulheres com esse diagnóstico mostra lesões uterinas significantes, incluindo hiperplasia atípica e adenocarcinoma do endométrio.

Considerando as anormalidades em células glandulares endocervicais, a eliminação do termo *provavelmente reativo* foi justificada pelo fato de que cerca de um terço dos casos qualificados dessa maneira mostrou lesões de alto grau, incluindo um número expressivo de carcinomas invasivos nas avaliações de seguimento[29]. Além disso, a prevalência de neoplasias clinicamente significantes detectadas em mulheres com diagnóstico de AGUS provavelmente reativo mostrou-se semelhante à prevalência de lesões em mulheres encaminhadas por diagnóstico de AGC sem outras especificações (SOE). A separação entre AGC-SOE e AGC provavelmente neoplá-

sica (NEO) foi necessária porque a prevalência de neoplasias significantes é expressivamente maior depois de um diagnóstico de AGC-NEO (27 a 96%) quando comparada às observada depois de um diagnóstico de AGC-SOE (9 a 41%)[28].

Ainda como resultado do melhor conhecimento das anormalidades de células glandulares, em 2001 foi introduzido o diagnóstico citológico de adenocarcinoma *in situ*, confirmado pela histopatologia em 48 a 69% dos casos. Cerca de 40% dessas mulheres apresentam adenocarcinoma invasivo inicial ou bem diferenciado. Esse fato é explicado pela semelhança de critérios citomorfológicos entre essas lesões[28].

Nessa nova versão, também foram descritas várias apresentações citológicas dos diferentes tipos histológicos de adenocarcinoma endocervical invasivo em citologia convencional; também foram destacadas as diferenças morfológicas observadas nas lesões glandulares em meio líquido.

Quadro 10.1 – O sistema de Bethesda (2001)

- Tipo do espécime:
  - Esfregaço convencional
  - Preparação em meio líquido
  - Outros
- Adequabilidade do espécime:
  - Satisfatória para a avaliação (descrever presença ou ausência de células endocervicais/componentes da zona de transformação e qualquer outro indicador de qualidade, p. ex., parcialmente obscurecido por sangue, inflamação etc.)
  - Insatisfatório para avaliação (especificar o motivo)
    - Amostra rejeitada/não processada (especificar o motivo)
    - Espécime processado e examinado, mas insatisfatório para avaliação de anormalidades epiteliais (especificar o motivo)
- Classificação geral (opcional):
  - Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade
  - Anormalidade de células epiteliais: ver *Interpretação/Resultados* (especificar se escamosa ou glandular)
- Outros: ver *Interpretação/Resultados* (p. ex., células endometriais em mulheres com idade igual ou maior que 40 anos)
- Interpretação/resultados: negativos para lesão intraepitelial ou malignidade
  - Organismos:
    - *Trichomonas vaginalis*
    - Organismos fúngicos morfologicamente consistentes com as espécies de *Candida*
    - Desvio na flora sugestivo de vaginose bacteriana
    - Bactérias morfologicamente consistentes com espécies *Actinomyces*
    - Alterações celulares consistentes com o herpes-vírus simples
  - Outros achados não neoplásicos (relatório facultativo; lista não exaustiva):
    - Alterações celulares reativas associadas com:
      - Inflamação (incluindo reparo típico)
      - Radiação
      - DIU
    - Presença de células glandulares em pós-histerectomia
    - Atrofia
- Anormalidades em células epiteliais:
  - Células escamosas
    - ASC
      - ASC-US
      - Não pode excluir HSIL (ASC-H)
    - LSIL, incluindo efeito citopático de HPV, displasia leve, NIC I
    - HSIL, incluindo displasia moderada, displasia grave, carcinoma *in situ*, NIC II, NIC III
      - Com características suspeitas de invasão
    - Carcinoma de células escamosas
  - Células glandulares
    - AGC-SOE
      - Endocervicais (SOE) ou especificar nos comentários
      - Endometriais (SOE) ou especificar nos comentários
      - Glandulares (SOE) ou especificar nos comentários
    - AGC-NEO
      - Endocervicais, provavelmente neoplásicas
      - Glandulares, provavelmente neoplásicas
    - AIS
    - Adenocarcinoma
      - Endocervical
      - Endometrial
      - Extrauterino
      - SOE
  - Outros
    - Células endometriais em uma mulher com idade igual ou superior a 40 anos de idade
  - Outras neoplasias malignas
    - Especificar
- Testes auxiliares:
  - Breve descrição do método de teste e relatório do resultado. Em qualquer citologia.
- Análise automatizada:
  - Especificar o aparelho e o resultado
- Notas educacionais e sugestões (opcional)

978-85-4120-024-0

Há, ainda, descrições para os achados citológicos de adenocarcinomas endometriais, destacando a ampla relação entre a citomorfologia e o grau de diferenciação do tumor; também é evidenciada a hipótese diagnóstica de adenocarcinomas extrauterinos em casos de fundo limpo ou morfologia incomum para as neoplasias do colo do útero. Tumores metastáticos também são considerados e descritos. A utilização da citologia para avaliação das regiões anal e retal é considerada, inclusive, em relação à adequabilidade da amostra e à interpretação dos critérios citomorfológicos (Quadro 10.1) [30,31].

Em relação aos exames auxiliares, a versão de 2001 orienta a descrever resumidamente o teste realizado e a apresentar o resultado com clareza, contudo não promove nem desestimula a realização de testes auxiliares juntamente com a citologia cervical. Há, nessa versão, o destaque para o fato de a Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical ter sugerido a realização do teste de HPV de alto risco oncogênico a mulheres com diagnósticos de ASC-US ou ASC-H, quando esse teste puder ser realizado em amostra já disponível. Essa orientação baseou-se no fato de a sensibilidade desse teste ser equivalente à da colposcopia na identificação de mulheres com NIC II e NIC III, o que reduziria a quantidade de encaminhamentos para colposcopia em quase 50%, sendo custo-efetivo. Contudo, essa não é a realidade brasileira, considerando os custos da colposcopia e dos testes para HPV de alto risco oncogênico.

Atualmente há muitas críticas ao exame citológico, principalmente em razão de resultados falso-negativos; todavia, ainda é o método preconizado para o rastreamento do câncer do colo uterino. A Tabela 10.1 mostra a relação entre as nomenclaturas citológicas e histológicas do carcinoma escamoso do colo uterino e as suas lesões precursoras. A rigor, o sistema de Bethesda foi uma iniciativa norte-americana, produto de reflexão e discussão entre citopatologistas, citotécnicos, ginecologistas e epidemiologistas. Em todas as versões, a classificação usada no sistema de Bethesda não é histogenética, mas uma nomenclatura designada a facilitar a categorização e as informações constantes do laudo citológico. É natural que as classificações atualmente utilizadas sejam modificadas à medida que o conhecimento sobre a doença evolua e que novas técnicas diagnósticas, como a citologia em meio líquido, estejam amplamente disponíveis. A meta final dessas revisões deve representar um ganho para o rastreamento e o controle do carcinoma de colo uterino.

Tabela 10.1 – Relação entre as nomenclaturas citológicas e histológicas do carcinoma escamoso do colo uterino e suas lesões precursoras

	Ano	Sem evidências de doença	Atipias indefinidas	Lesões de baixo grau	Lesões de alto grau	Carcinoma invasor
Classificação de Papanicolaou (c)	1943	Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV	Classe V
Classificação de Reagan e Patten (h)	1962			Displasia leve	Displasia moderada ou grave ou carcinoma *in situ*	Carcinoma invasor
Classificação original de Richart (h)	1969			NIC I	NIC II ou NIC III	Carcinoma invasor
Classificação modificada de Richart (h)	1988			NIC de baixo grau	NIC de alto grau	Carcinoma invasor
Sistema de Bethesda (c)	2001	Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade	ASC-US ou ASC-H	LSIL	HSIL	Carcinoma invasor

(c) = classificação citológica; (h) = classificação histológica.

978-85-4120-024-0

Referências

1. BRODERS, A. C. Carcinoma "in situ" contrasted with benign penetrating epithelium. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 99, n. 20, p. 1670-1674, 1932.
2. KOSS, L. G.; MELAMED, M. R. **Koss' Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases.** 5. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p. 282.
3. BABÉS, A. Diagnostic du cancer du col uterin par les frottis. **Presse Med.**, v. 36, p. 451-454, 1928.
4. PAPANICOLAOU, G. N. New cancer diagnosis. In: **Proceedings of the Third Race Betterment Conference**. Battle Creek, Michigan: Race Betterment Foundation, 1928.
5. PAPANICOLAOU, G. N.; TRAUT, H. F. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 42, p. 193-206, 1941.
6. WIED, G. Pap-test or Babés method? **Acta. Cytol.**, v. 3, p. 173-174, 1964.
7. DIAMANTIS, A.; MAGIORKINIS, E.; ANDROUTSOS, G. What's in a name? Evidence that Papanicolaou, not Babés, deserves credit for the Pap test. **Diagn. Cytopathol.**, v. 38, n. 7, p. 473-476, 2010.
8. NAYLOR, B.; TASCA, L.; BARTZIOTA, E. et al. In Romania it's the méthode Babe-Papanicolaou. **Acta. Cytol.**, v. 46, p. 1, 2002.
9. ANDERSON, G. H.; BOYES, D. A.; BENEDET, J. L. et al. Organization and results of the cervical cytology screening programme in British Columbia, 1955-85. **Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)**, v. 296, n. 6627, p. 975-978, 1988.
10. DEMAY, R. M. **The Art and Science of Cytopathology**. 1. ed., Chicago: American Society of Clinical Pathologists (ASCP Press), 1996. p. 61-205.
11. PAPANICOLAOU, G. N. **Atlas of Exfoliative Cytology**. Cambridge, Mass. The Commonwealth Found by Harvard University Press, 1954.
12. REAGAN, J. W.; SEIDEMANN, I. L.; SARACUSA, Y. The cellular morphology of carcinoma "in situ" and displasia or atypical hyperplasia of uterine cervix. **Cancer**, v. 6, p. 224-235, 1953.
13. RICHART, R. M. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 7, p. 748-784, 1968.
14. RICHART, R. M. Colpomicroscopy studies of the distribution of dysplasia and carcinoma in situ on the exposed portion of human uterine cervix. **Cancer**, v. 18, p. 950-954, 1965.
15. RICHART, R. M. Cervical intraepithelial neoplasia. In: SOMMERS, C. C.. **Pathology Annual**. New York: Appleton--Century-Crofts, 1973. p. 301-328.
16. HOWELL, L. P.; WILTON, M.; BISHOP, J. et al. Living with uncertainty: equivocal Pap test results and the evolution of ASC terminology. **Diagn. Cytopathol.**, v. 38, n. 3, p. 221-232, 2010. Review.
17. WIED, G. L.; KEEBLER, C. M.; KOSS, L. G. et al. **Compendium on Diagnostic Cytology**. 6. ed., Chicago, IL: Tutorials of Cytology, 1988.
18. MELAMED, M. R. Letter: coded diagnoses by pathologists. **New Engl. J. Med.**, v. 293, p. 458-459, 1975.
19. KURMAN, R. J.; SOLOMON, D. **The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Diagnoses**. New York: Springer--Verlag, 1994. p. 81.
20. SHERMAN, M. E.; ABDUL-KARIM, F. W.; BEREK, J. S. et al. Atypical squamous cells. In: SOLOMON, D.; NAYAR, R. **The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology:** definitions, criteria and explanatory notes. 2. ed., New York: Springler-Verlag, 2004, p. 67-88, Cap. 4.
21. ÖSTOR, A. G. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v. 12, p. 186-192, 1993.
22. SOLOMON, D.; NAYAR, R. **The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology**. 2. ed., New York: Springer--Verlag, 2004. p. 191.
23. WRIGHT, T. C.; GATSCHA, R. M.; LUFF, R. D. et al. Epitelial abnormalities: squamous. In: SOLOMON, D.; NAYAR, R. **The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology:** definitions, criteria and explanatory notes. 2. ed., New York: Springer-Verlag, 2004. p. 89-121. Cap. 5.
24. DAVEY, D. D.; WOODHOUSE, S.; STYER, J. et al. Atypical epithelial cells and specimen adequacy: current laboratory practices of participants in the college of American Pathologists interlaboratory comparison program in cervicovaginal cytology. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 124, p. 203-211, 2000.
25. VIZCAINO, A. P.; MORENO, V.; BOSCH, F. X. et al. International trends in the incidence of cervical cancer I. Adenocarcinomas and adenosquamous cell carcinomas. **Int. J. Cancer**, v. 75, p. 536-545, 1998.
26. FRANCO, E. L.; DUARTE-FRANCO, E.; FERENCZY, A. Cervical cancer: epidemiology prevention and the role of human papillomavirus infection. **C. M. A. J.**, v. 164, n. 7, p. 1017-1025, 2001.
27. LIU, S.; SEMENCIW, R.; PROBERT, A. et al. Cervical cancer in Canada: changing patterns in incidence and mortality. **Int. J. Gynecol. Cancer**, v. 11, n. 1, p. 24-31, 2001.
28. WRIGHT, T. C. JR.; MASSAD, L. S.; DUNTON, C. J. et al. 2006 American Society for Colposcopy and Cervical Pathology-sponsored Consensus Conference. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 197, n. 4, p. 346-355, 2007.
29. COVELL, J. L.; WILBUR, D. C.; GUIDOS, B. et al. Epithelial abnormalities: glandular. In: SOLOMON, D.; NAYAR, R. **The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology:** definitions, criteria and explanatory notes. 2. ed., New York: Springer-Verlag, 2004, p. 123-156. Cap. 6.
30. TABBARA, S. O.; COVELL, J. L. Other malignant neoplasms. In: SOLOMON, D.; NAYAR, R. **The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology:** definitions, criteria and explanatory notes. 2. ed., New York: Springer-Verlag, 2004, p. 157-167. Cap. 7.
31. DARRAGH, T. M.; BIRDSONG, G. G.; LUFF, R. D. et al. Anal-rectal cytology. In: SOLOMON, D.; NAYAR, R. **The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology:** definitions, criteria and explanatory notes. 2. ed., New York: Springer-Verlag, 2004, p. 169-175. Cap. 8.

Capítulo 11

Carcinoma Escamoso e Atipias

Douglas Munhoz
Laura Beatriz da Silva Cardeal
Silvya Stuchi Maria-Engler

HPV E NEOPLASIAS DA CÉRVICE UTERINA

A descoberta da existência de câncer relacionado com o colo uterino data de 1877. Em 1920, o médico inglês, Hinsermann, desenvolveu o colposcópio, instrumento destinado a analisar o epitélio do colo uterino e obter biopsias. O primeiro pesquisador a sugerir a coleta de material do colo para diagnóstico de câncer foi o patologista Aureli Babés, em 1928. Já em 1941, Papanicolaou e Traut estabeleceram, mediante a descrição das células atípicas presentes nos esfregaços, a possibilidade do diagnóstico de carcinoma do colo uterino. Com isso, o rastreamento do câncer do colo por meio do exame citológico, bem como a proliferação dos laboratórios com essa finalidade, estendeu-se pelo mundo todo, intensificando a missão da citologia clínica de diagnosticar precocemente os eventos celulares associados ao câncer de colo uterino.

A história fascinante da prevenção do câncer de colo uterino se dá pelo fato de ser um tumor completamente evitável, desde que seja precocemente reconhecido. Nesse sentido, a citopatologia clínica tornou-se fundamental como instrumento de diagnóstico. Em 2008, o prêmio Nobel de Medicina foi recebido por três virologistas: Françoise Barré-Sinoussi e Luc Montagnier, pelo isolamento do HIV, e Harald zur Hausen, pela detecção e pelo isolamento dos tipos 16 e 18 de DNA do HPV no câncer cervical. Zur Hausen e seus colegas contribuíram, portanto, na elucidação das causas do câncer cervical, uma vez que HPV 16 e 18 são os dois tipos mais carcinogênicos e responsáveis pela maioria dos

tumores cervicais e por cerca de 50% da neoplasia intraepitelial cervical (NIC III/HSIL)[19]. Os trabalhos epidemiológicos de Nubia Muñoz e seus colegas demonstraram, com base nos estudos moleculares e da biologia do HPV, que a infecção com tipos específicos de HPV genital é a causa do câncer cervical[1]. O HPV foi, assim, considerado o agente etiológico dos tumores cérvico-uterinos[2-7].

Etapas essenciais estão associadas ao câncer cervical: a transmissão do HPV, a persistência de infecção viral de HPV de alto risco oncogênico, a progressão de um clone celular com infecção persistente a uma lesão pré-cancerosa e a invasão tumoral. Antes de seu desenvolvimento, o câncer cervical é precedido de mudanças na cérvice, principalmente na zona de transformação, denominada junção epitélio escamocolunar, região de encontro da ectocérvice (epitélio escamoso estratificado não queratinizado) com a endocérvice[8], como descrito no Capítulo 1. Essa região é altamente suscetível a infecção pelo HPV: 90% das neoplasias do trato genital iniciam-se nesse local. Por motivos ainda não esclarecidos, a infecção persistente por HPV em zonas de transformação entre diferentes epitélios está relacionada com a causa de outros tumores além do de cérvice uterina, como o de ânus, pênis e de orofaringe[8-10].

Os tipos de HPV 16, 18 e 45 são observados em uma alta fração de tumores invasivos, sendo o 16 e o 18 considerados os mais carcinogênicos, uma vez que são responsáveis por 70% dos casos de câncer cervical e cerca de 50% dos casos de HSIL; já entre os tipos de baixo risco oncogênico, o 6 e o 11 são responsáveis por aproximadamente 90% das verrugas genitais[1]. O HPV 16 também é considerado o agente causal em alguns casos de vulva, ânus, pênis e cabeça e pescoço, como o carcinoma da orofaringe[11-17].

Segundo revisão de Stanley 2010[1], a infecção pelo HPV é muito comum. A maioria das mulheres no mundo será infectada com HPV genital em algum momento de suas vidas, com risco de infecção de 50 a 80%. Em algum determinado momento, cerca de 10% das mulheres com citologia cervical normal serão positivas para DNA do HPV em seus colos uterinos, embora existam diferenças geográficas na prevalência.

Como relatado no Capítulo 10, vale ressaltar que, desde que Papanicolaou introduziu o método de esfregaço na década de 1940, uma variedade de termos é utilizada para descrever o diagnóstico citológico. A classificação de Bethesda, proposta em 1988 e revisada em 1991, 2001 e 2008, subdivide as células escamosas anormais em quatro grupos: (1) ASC; (2) LSIL, anteriormente denominada displasia leve ou neoplasia intraepitelial de baixo grau (NIC I); (3) HSIL, incluindo displasia moderada e NIC II, displasia grave e NIC III/carcinoma *in situ*; e (4) carcinoma escamoso.

Assim, o termo NIC foi introduzido para descrever, citológica e histologicamente, a extensão das alterações epiteliais pré-neoplásicas, referenciando os extratos epiteliais alterados. As NIC são caracterizadas em relação à fração do epitélio que se mostra alterada. Dessa forma, a NIC I caracteriza-se pelas alterações celulares do terço superior do epitélio, ao passo que a NIC II, por atipias celulares nos dois terços inferiores do epitélio, sendo observada uma maior relação núcleo/citoplasma e, também, a presença de células mitóticas. As NIC III apresentam diferenciação e estratificação do epitélio praticamente ausentes, com atipias nucleares e um grande número de figuras mitóticas presentes, e seu aspecto histológico remete ao carcinoma *in situ*[2-5].

A literatura mostra que cerca de 75% das mulheres controlam a infecção, eliminando o vírus no período de 12 meses[11]. Aproximadamente 50% das LSIL regridem para normalidade ou ASC-US no período de seis meses[12]. Além disso, estima-se que apenas 12 a 22% das HSIL persistam ou progridam para carcinoma invasivo[13].

A média de idade das pacientes diagnosticadas com lesões pré-cancerosas é de 25 a 35 anos, sendo o pico de risco para carcinoma invasivo entre 35 e 55 anos. Essa distribuição deve-se ao fato de os carcinomas cervicais se originarem, principalmente, por infecções pelo HPV de alto risco oncogênico adquiridas na adolescência e no início da fase adulta. A média de tempo entre a infecção por HPV e o aparecimento entre lesões pré-cancerosas é menor que a média de tempo entre a progressão dessas lesões e o carcinoma invasor, sugerindo que apenas a minoria desses

tumores apresenta fenótipo invasivo. O tempo entre a infecção e o aparecimento da primeira evidência microscópica de lesões pré-câncer pode ser curto, geralmente de cinco anos. A infecção por HPV 16 possui risco absoluto em diagnóstico de lesões pré-câncer de cerca de 40% após três a cinco anos de infecção persistente. Lesões preexistentes na região cervical persistem por mais tempo e progridem mais rapidamente em mulheres infectadas com HPV oncogênicos (de alto risco) do que naquelas infectadas com HPV não oncogênicos (de baixo risco) ou não infectadas. O tempo de *clearence* nas pacientes infectadas é maior para infecções por HPV oncogênicos do que para os não oncogênicos[12-17].

INTERAÇÃO CÉLULA-MATRIZ EXTRACELULAR CONTRIBUINDO PARA A INVASÃO TUMORAL

Os carcinomas são tumores malignos de estrutura complexa, compostos de células malignas de origem epitelial e outros tipos celulares que compõem o estroma tumoral, como fibroblastos, células endoteliais, pericitos, adipócitos, linfócitos, macrófagos, granulócitos e células mieloides imaturas, que podem ser identificados no tumor e ao redor dele. Além disso, a composição da matriz extracelular e a presença de diferentes citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e outros fatores solúveis, secretados pelos vários tipos celulares presentes, aumentam a complexidade dessas estruturas. Essa combinação cria um microambiente tumoral único que pode modificar as propriedades das células neoplásicas. De fato, o ambiente pode levar à seleção de células tumorais mais bem adaptadas para sobreviver nessas condições e mais eficientes para evadir o sistema imune. Os outros tipos celulares presentes também podem ser influenciados pelo ambiente tumoral e desempenhar um papel importante na progressão do tumor. Assim, macrófagos ou células mieloides infiltrantes que sofrem diferenciação no ambiente tumoral podem apresentar efeito supressor da resposta imune celular antitumoral ou induzir a angiogênese[18]. Paralelamente, os fibroblastos presentes na região tumoral podem secretar fatores de crescimento que induzem a proliferação de outros tipos celulares[19].

A transformação de uma neoplasia não invasiva em um carcinoma invasivo de cérvice uterina (SCC, *squamous cell carcinoma*) está acompanhada, inicialmente, de interrupção focal e, em seguida, degradação da lâmina basal por proteases. Os carcinomas escamosos microinvasivos (profundidade de invasão menor que 3 mm) possuem taxa de metástase inferior a 1%, sendo a de sobrevivência ao redor de 100%. Quando o tumor invade mais que 5 mm em direção à submucosa, confina-se na cérvice e penetra nos microvasos[20,21]. As metástases para regiões extrapélvicas são relativamente raras, e apenas 5% das pacientes com diagnóstico de tumores primários apresentam metástases distantes[22].

A MEC é definida como uma mistura heterogênea de macromoléculas (incluindo colágenos e glicoproteínas não colagênicas, fibras elásticas e proteoglicanos) capaz de se automodelar, propiciando suporte mecânico para células e tecidos. A MEC deixou de ser vista apenas como suporte mecânico, mas também como fonte de informações e como reservatório de fatores de crescimento que atuam cooperativamente para regular a ampla variedade de processos celulares[23].

A degradação da MEC é mediada por algumas famílias de proteinases extracelulares, que incluem as serina-proteases, as cisteína-proteases e as MMP dependentes de zinco. As MMP são enzimas-chave que regulam uma grande variedade de processos fisiológicos e eventos de sinalização, tornando-se moléculas fundamentais na comunicação entre o tumor e o estroma[24]. No câncer, os níveis alterados e o desequilíbrio na distribuição das proteases favorecem a degradação da MEC e representam um aumento no potencial invasivo desde os primeiros estágios da tumorigênese e do crescimento do tumor primário até os processos de invasão, metástase e angiogênese[23-25]. Estudos em humanos mostram associação direta entre aumento da expressão de MMP e invasividade tumoral, desenvolvimento de metástases, recorrência de tumores e baixa taxa de sobrevivência[26]. Níveis

elevados de diferentes MMP podem ser detectados nos tecidos tumorais ou no soro de pacientes em estágios de câncer avançados, e seu papel como indicador de prognóstico em neoplasias vem sendo estudado[26].

Alguns trabalhos descrevem a degradação da MEC, com ação das MMP (MMP-2 e MMP-9) em carcinomas escamosos da cérvice uterina no processo de invasão, permeação linfovascular, metástase (nodal) e recorrência de tumores[26, 27]. Brummer *et al.*[26] descreveram a expressão de MMP-2 em lesões pré-invasivas de cérvice uterina e a consecutiva coexpressão de MMP-1 e MMP-2 em tumores invasivos, sugerindo o aumento gradual no potencial invasivo. Relatou-se, também, que a expressão de MMP-2, quando observada em lesões intraepiteliais de alto grau, pode indicar tumores com aumento de risco de invasão. Por fim, tem-se relatado a associação entre a MMP (MMP-2, MMP-9 e MMP-14) e o potencial maligno das neoplasias humanas de cérvice, com vistas à utilização dessas proteínas como marcadores prognósticos[21, 25-31].

ASC

Várias classificações foram criadas desde o surgimento do exame citológico do colo. O "sistema de Bethesda" será a classificação adotada neste capítulo (de acordo com o Capítulo 10).

A quantidade de células alteradas no esfregaço, a intensidade das alterações, os fatores obscurecedores e a qualidade de fixação do material determinam, na maioria das vezes, a utilização da denominação ASC. Portanto, ela não representa uma única entidade biológica, mas sim uma resposta exuberante a uma inflamação ou a uma amostra não representativa da lesão, constituindo um diagnóstico de exclusão. Esse achado citológico é de difícil reprodutibilidade entre os citologistas, devendo ocorrer em até 5% dos esfregaços cérvico-vaginais de rotina.

As ASC foram divididas em ASC-US e ASC-H.

Na categoria ASC-US (Figuras 11.1 a 11.21), as células apresentam-se com aumento nuclear de 2,5 a 3 vezes em relação ao tamanho do núcleo da célula intermediária normal, incluindo-se variação na forma nuclear, além de aumento discreto na relação núcleo/citoplasma. Pode-se observar binucleação, com hipercromatismo discreto com irregularidade, ainda que discreta, na distribuição da cromatina ou mesmo do formato da membrana nuclear. Essa membrana nuclear atípica pode ser observada em células com núcleos alterados associados a citoplasma orangeofílico[2]. A ASC-US representa 90 a 95% do total de diagnósticos de ASC e 4 a 6% do total de esfregaços.

A denominação ASC-H refere-se a células escamosas atípicas, cujo achado não permite a exclusão de lesão de alto grau (HSIL). Essas células são escamosas imaturas, com atipia nuclear

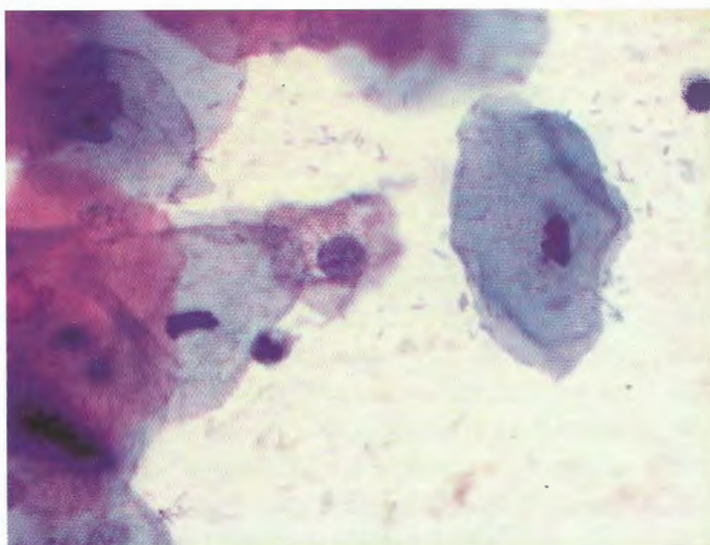



Figura 11.1 – Célula intermediária com aumento discreto do núcleo, com alguma granulosidade da cromatina e halo perinuclear.

Figura 11.2 – Células intermediárias com certo grau de degeneração, citoplasma queratinizado e núcleo denso hipercromático e halo perinuclear.

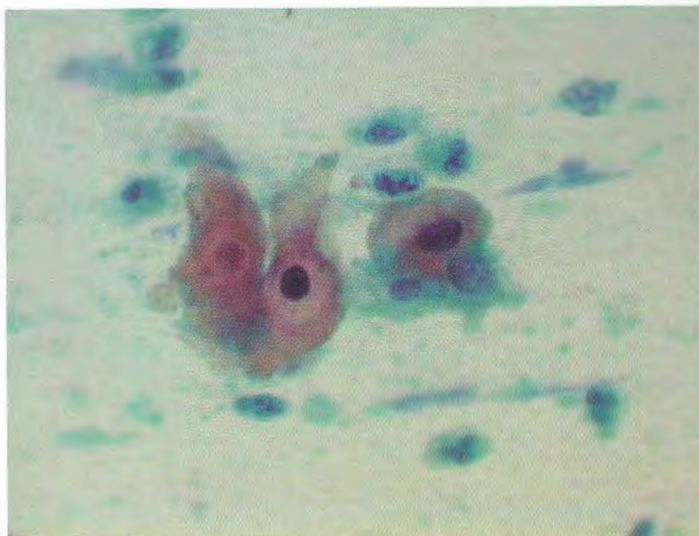



Figura 11.3 – Células intermediárias com aumento discreto do núcleo, com alguma granulosidade da cromatina.

Figura 11.4 – Célula intermediária binucleada com discreto aumento nuclear, citoplasma queratinizado e evidências de inflamação.

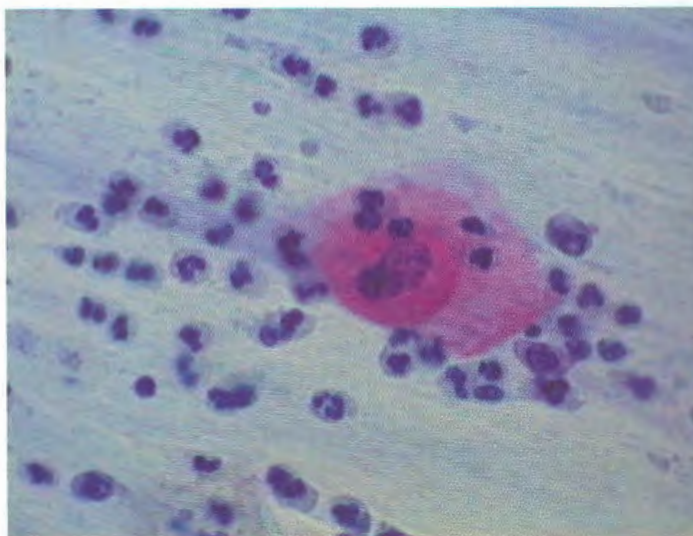
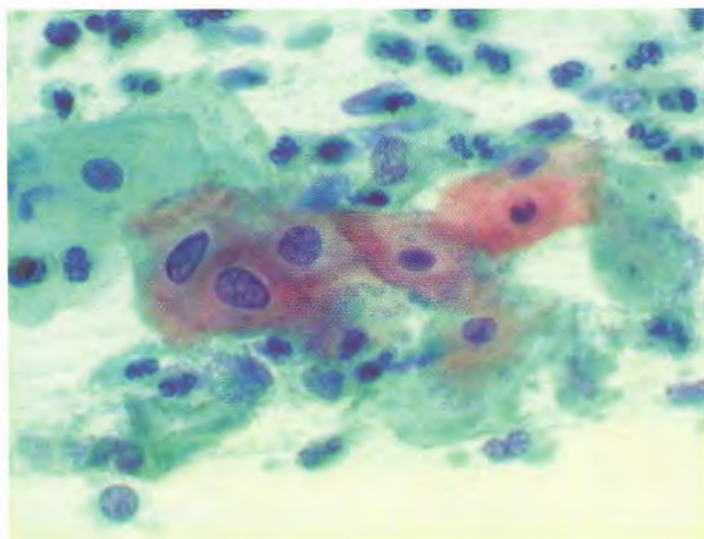



Figura 11.5 – Células intermediárias com núcleos aumentados de contornos lisos, cromatina granular e citoplasma queratinizado.

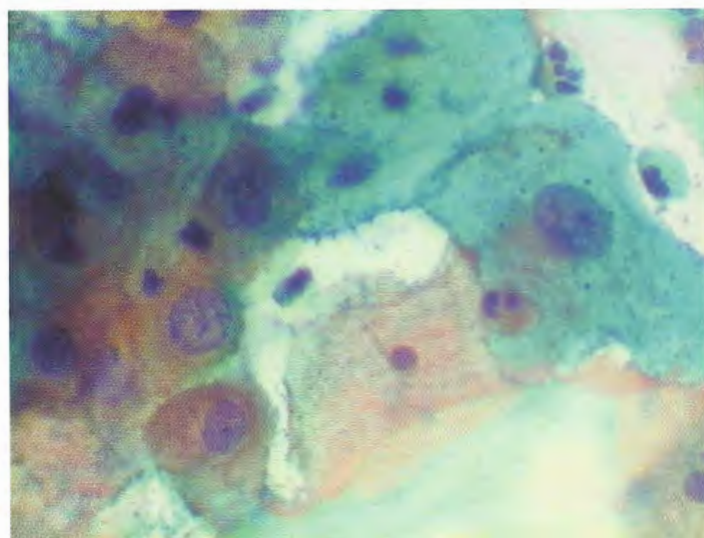



Figura 11.6 – Grupo de células intermediárias cobertas por bactérias, com aumento nuclear, discariose e claras evidências de inflamação.

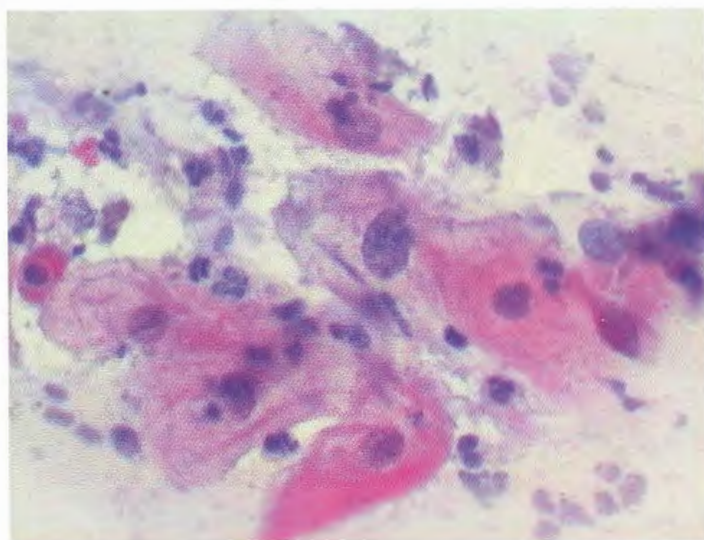



Figura 11.7 – Células intermediárias com sinais inflamatórios e uma célula apresentando cariomegalia, cromatina granular e leve irregularidade de contorno nuclear.

Figura 11.8 – Células intermediárias com discreto aumento nuclear, de contorno liso e cromatina com discreta granulosidade.

978-85-4120-024-0

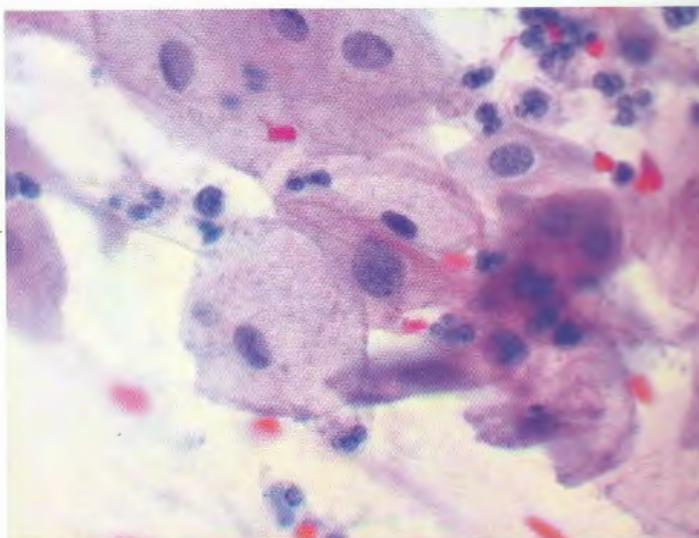



Figura 11.9 – Uma célula intermediária isolada com discreto aumento nuclear (comparar com os neutrófilos próximos), de contorno liso e cromatina discretamente granular.

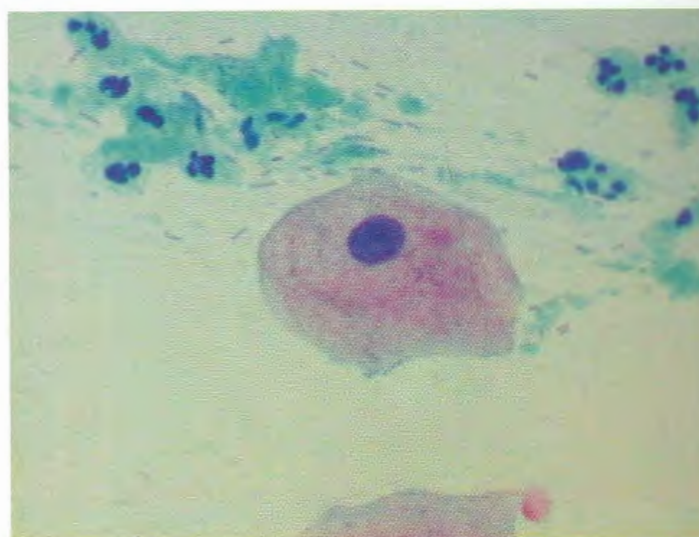



Figura 11.10 – Poucas células pequenas, algumas com citoplasma queratinizado e núcleos densos hipercromáticos.

978-85-4120-024-0

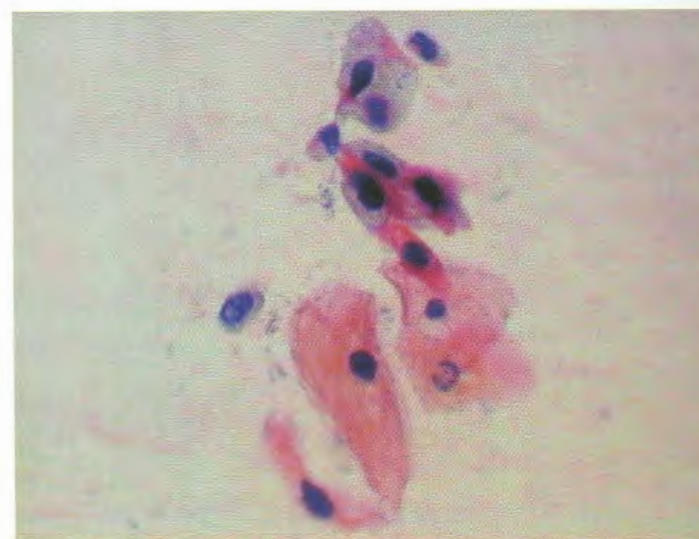
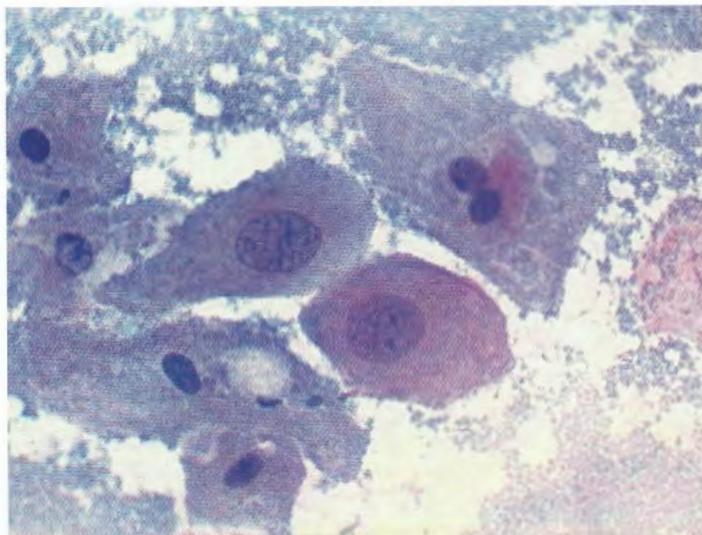



Figura 11.11 – Duas células intermediárias cobertas por bactérias com aumento nuclear e contornos lisos.

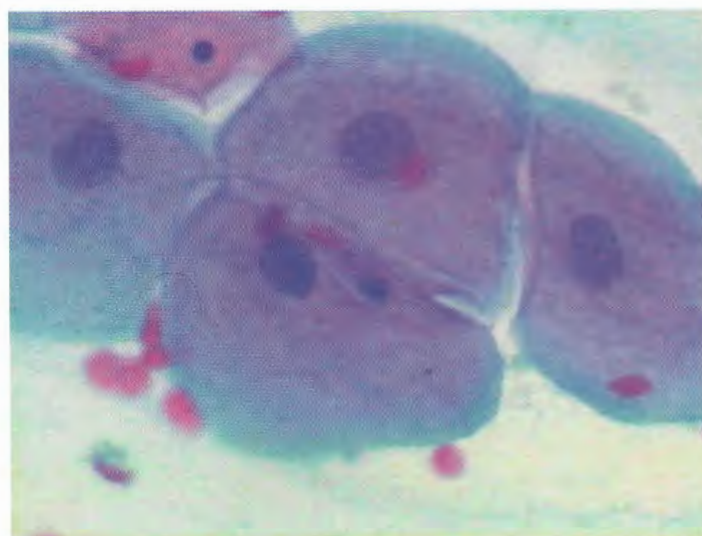



Figura 11.12 – Quatro células planas com núcleos aumentados, leve hipercromatismo nuclear e alguma granulosidade da cromatina.

Figura 11.13 – Célula intermediária isolada com discreto aumento nuclear de contorno liso e cromatina discretamente granular.

Figura 11.14 – Célula intermediária com núcleo maior em 2,5 vezes o núcleo das células intermediárias vizinhas e leve irregularidade do contorno nuclear.

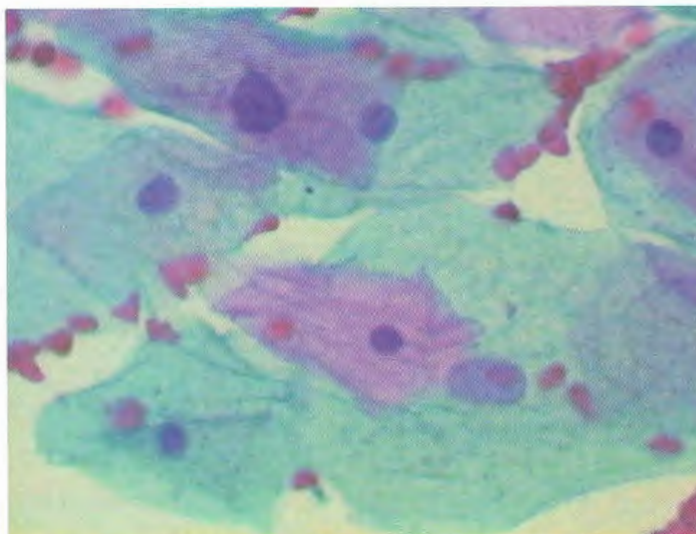



Figura 11.15 – Duas células planas com núcleos aumentados, leve hipercromatismo nuclear e alguma granulosidade da cromatina e leve discariose.

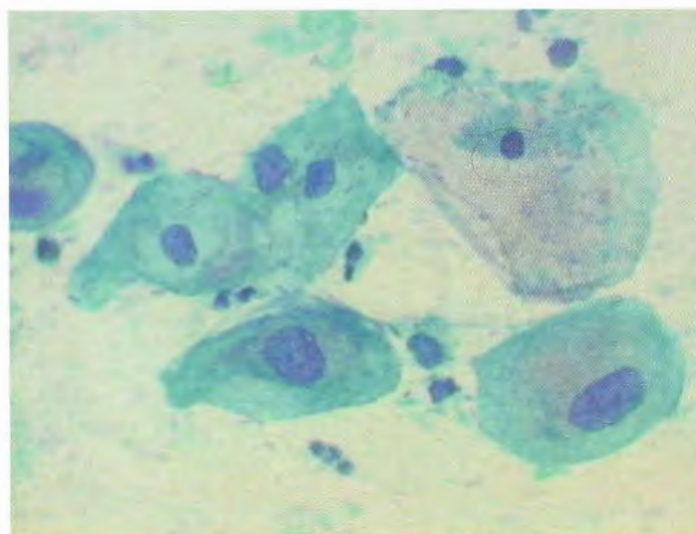



Figura 11.16 – Grupo de células intermediárias cobertas por bactérias e uma célula com aumento nuclear, cromatina granular e claras evidências de inflamação.

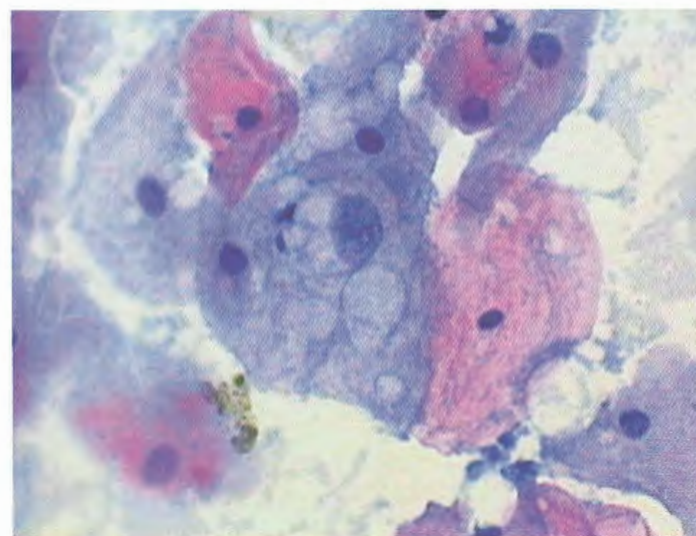
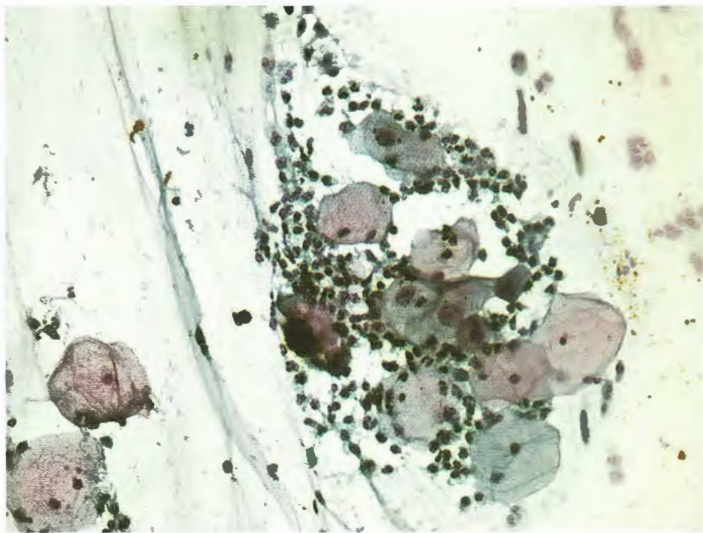



Figura 11.17 – Células superficiais normais e três células intermediárias com cariomegalia leve, hipercromatismo nuclear e esboço de halo coilocitótico.

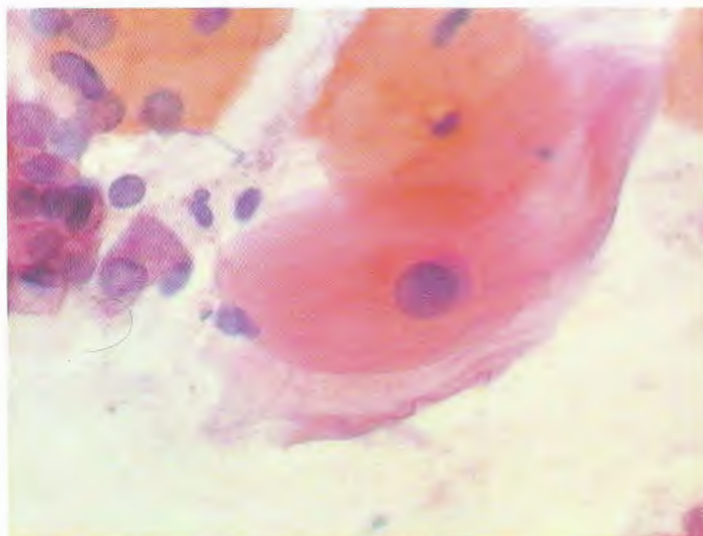



Figura 11.18 – Célula intermediária isolada com discreto aumento nuclear, de contorno liso e cromatina discretamente granular.

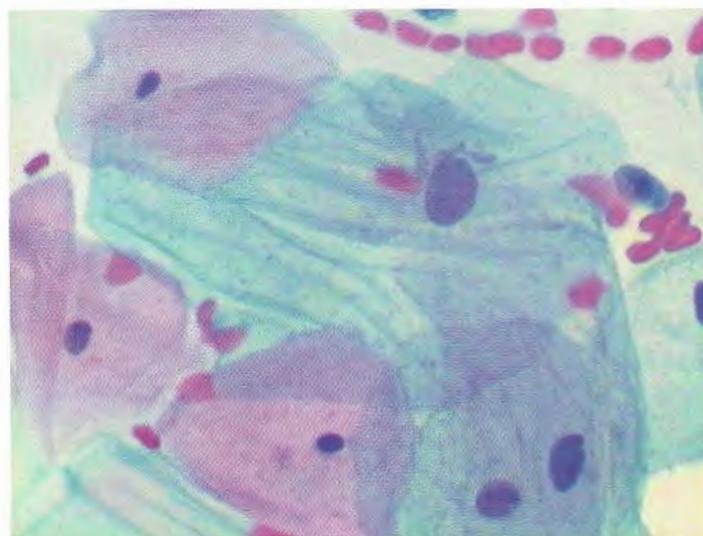
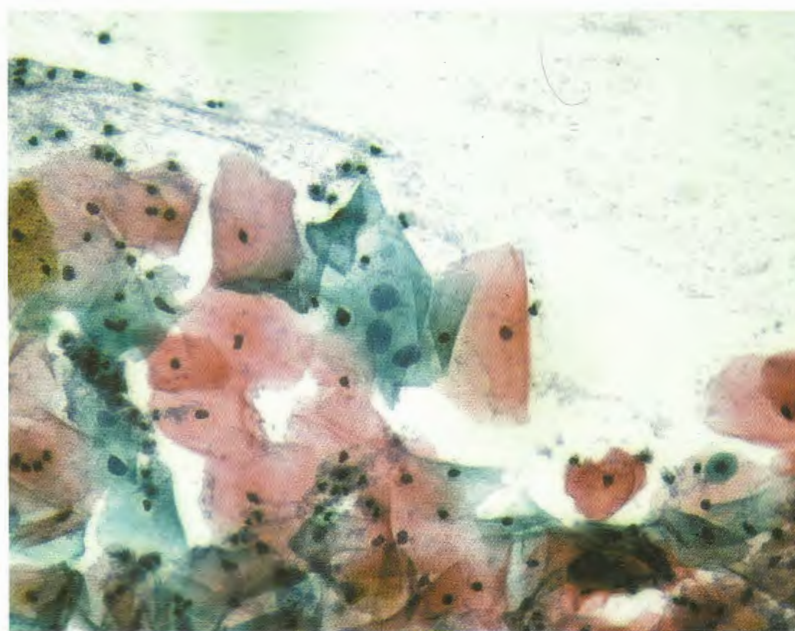



Figura 11.19 – Células intermediárias e superficiais, estando algumas com núcleos aumentados, de contorno liso e cromatina vesicular.

Figura 11.20 – Três células intermediárias com aumento nuclear, contornos lisos e cromatina vesicular.

Figura 11.21 – Muitas células intermediárias e superficiais normais e três células no centro do campo com núcleos 2,5 vezes maiores.

leve ou moderada, incluindo as características de metaplasia atípica, reparo celular atípico e epitélio atrófico com atipias. Apresentam-se mais comumente espalhadas na lâmina, com células isoladas ou com pequenos grupos que contêm menos de 10 células[2] (Figuras 11.22 a 11.37). A ASC-H representa de 5 a 10% do total de diagnósticos de ASC. Embora esse diagnóstico seja menos comum que a ASC-US, o risco de lesão de alto grau é elevado (24 a 94%). Uma vez identificada a categoria ASC-H, a paciente poderá ser acompanhada mais rigorosamente, incluindo a conduta de colposcopia ou biopsias.

Discute-se que a detecção de testes biomoleculares aumentaria a sensibilidade de detecção de NIC em mulheres diagnosticadas com ASC em exames citológicos repetidos. Dessa forma, um teste negativo de HPV em mulheres com ASC poderia limitar o número de colposcopias e reduzir biopsias desnecessárias[31].

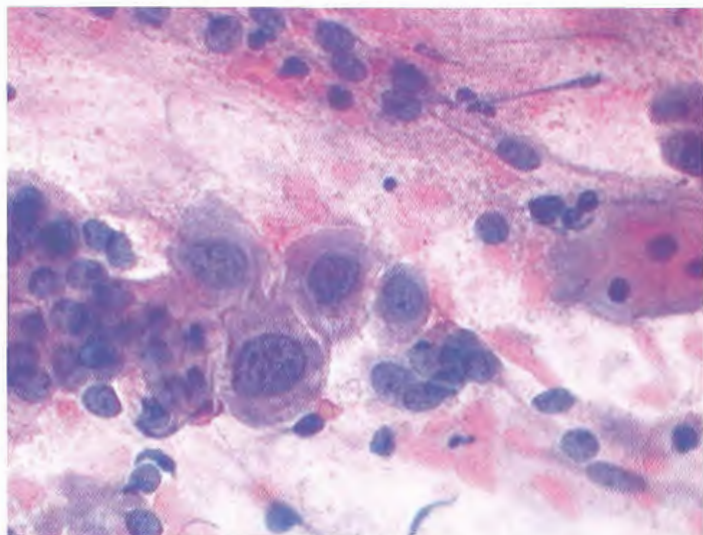



Figura 11.22 – Poucas células imaturas com aumento nuclear, alteração na relação núcleo/citoplasma em fundo hemorrágico.

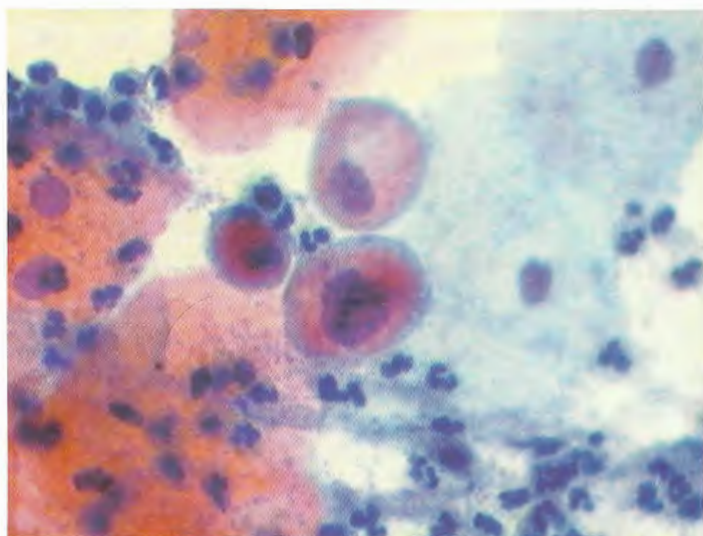



Figura 11.23 – Uma única célula multinucleada com aumento na relação núcleo/citoplasma e hipercromatismo nuclear.

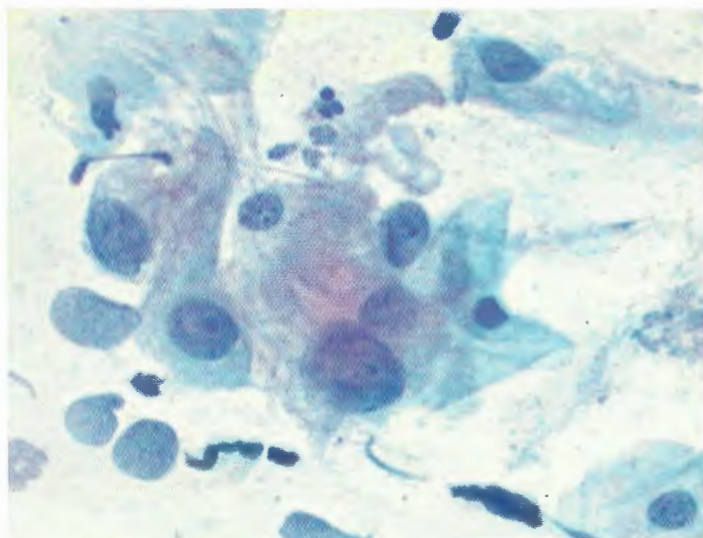



Figura 11.24 – Células imaturas com núcleos aumentados de diferentes tamanhos, um deles apresentando leve irregularidade na membrana nuclear.

Figura 11.25 – Quatro células metaplásicas com moderada discariose.

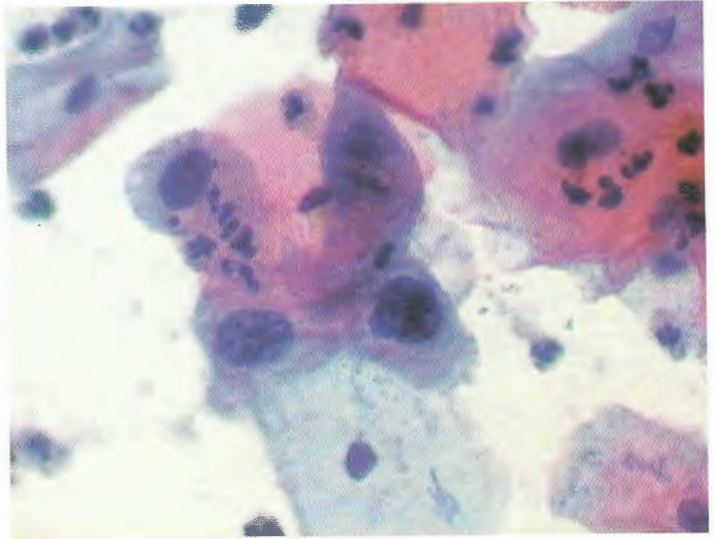



Figura 11.26 – Aumento nuclear com alteração na relação núcleo/citoplasma.

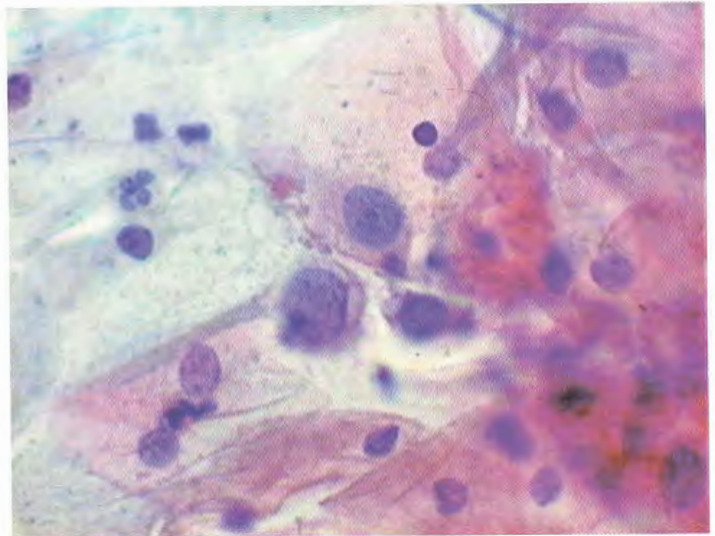



Figura 11.27 – Células imaturas com núcleos aumentados, hipercromáticos, de diferentes formas.

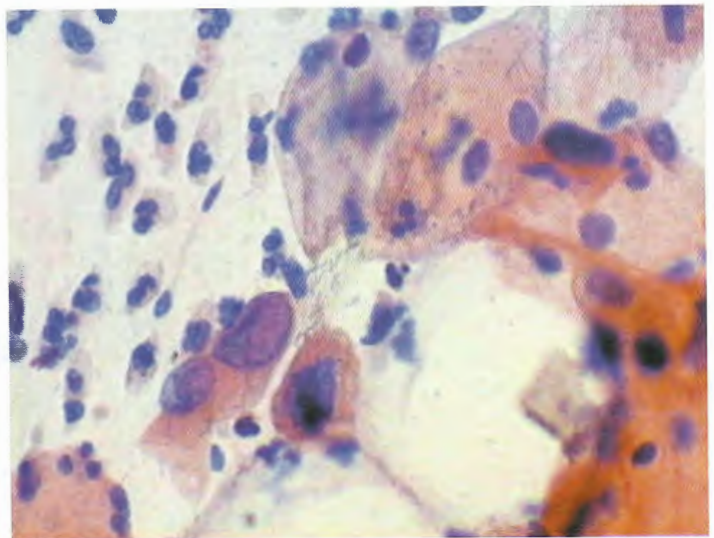
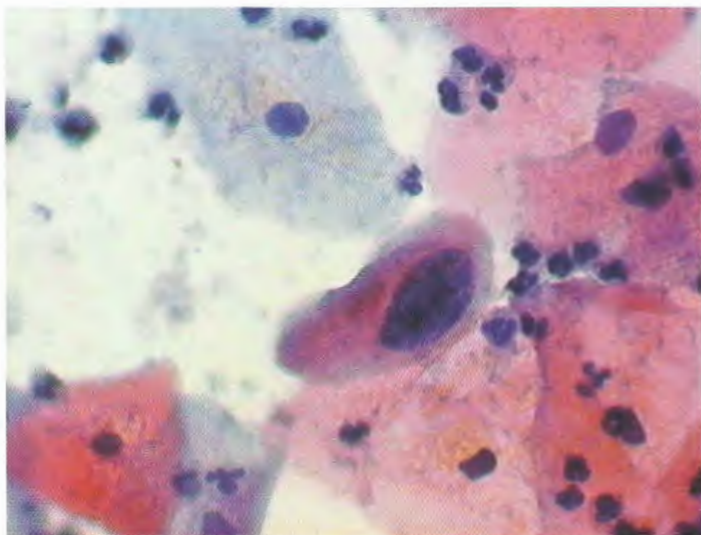



Figura 11.28 – Célula imatura com grande núcleo hipercromático.

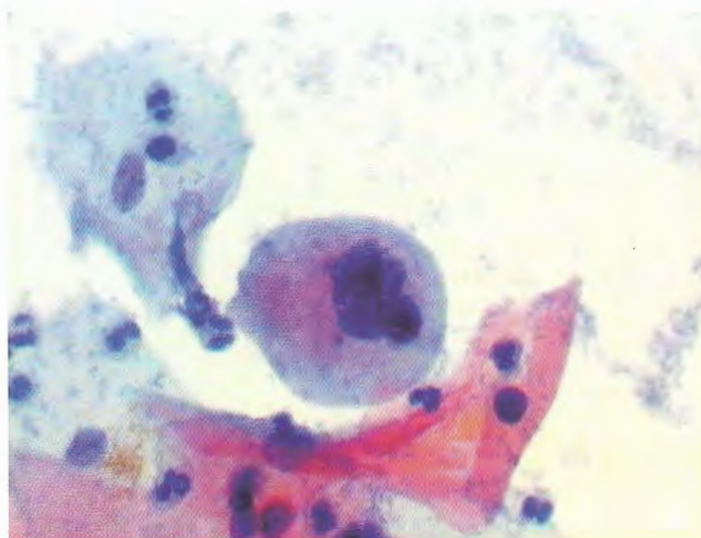



Figura 11.29 – Célula imatura multinucleada com intenso hipercromatismo nuclear

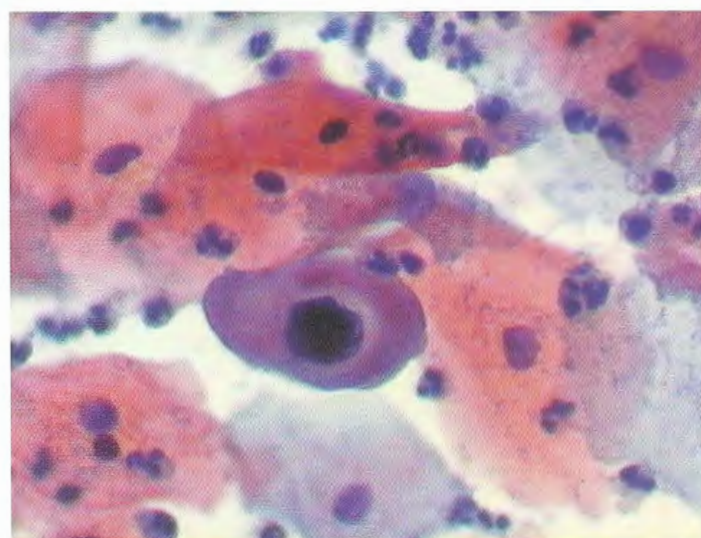



Figura 11.30 – Célula imatura com citoplasma denso e núcleo hipercromático, de limite irregular.

Figura 11.31 – Duas células com núcleos aumentados, irregulares e hipercromáticos.

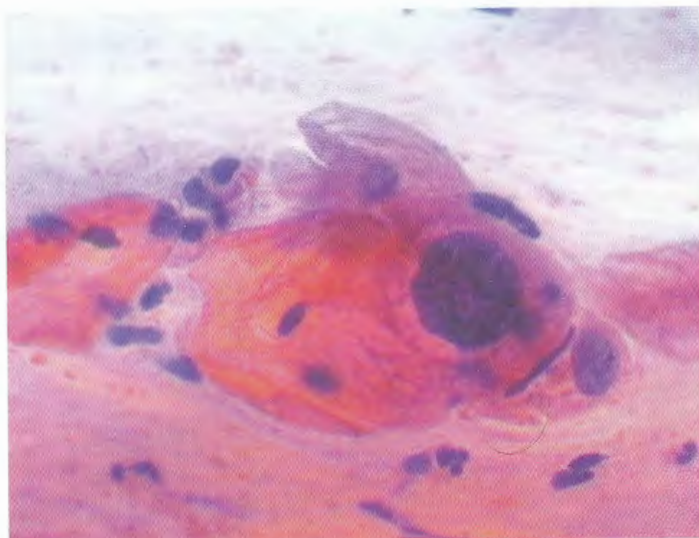



Figura 11.32 – Três células com alteração na relação núcleo/citoplasma e hipercromatismo nuclear.

978-85-4120-024-0

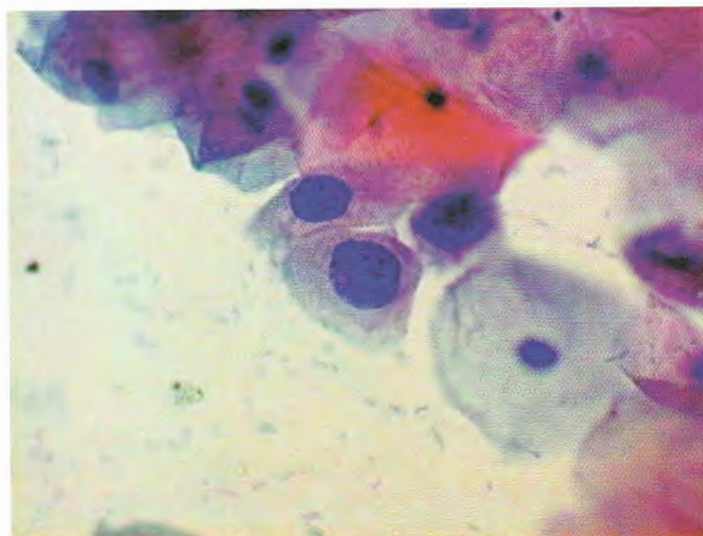



Figura 11.33 – Núcleos hipercromáticos com alteração na relação núcleo/citoplasma.

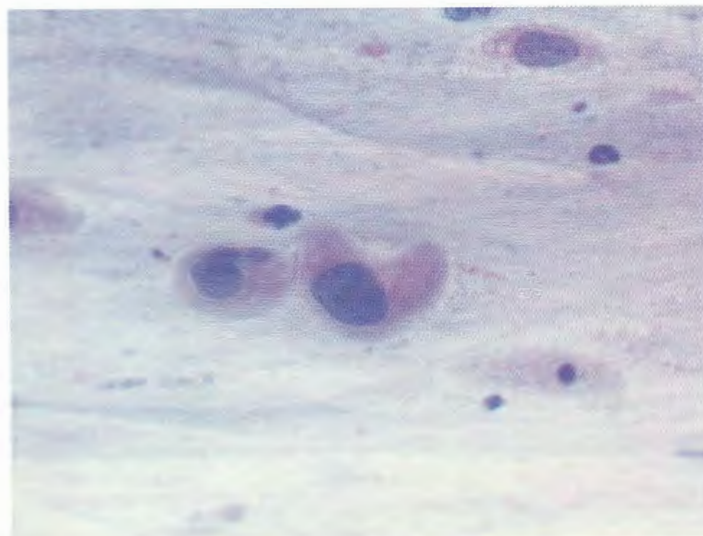
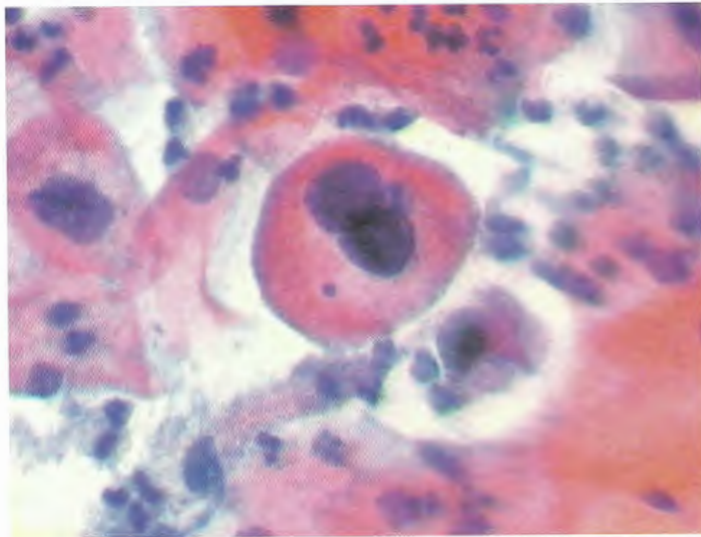



Figura 11.34 – Células parabasais binucleadas, com hipercromatismo nuclear.

Figura 11.35 – Células metaplásicas com discariose moderada e apresentando vacuolização citoplasmática.

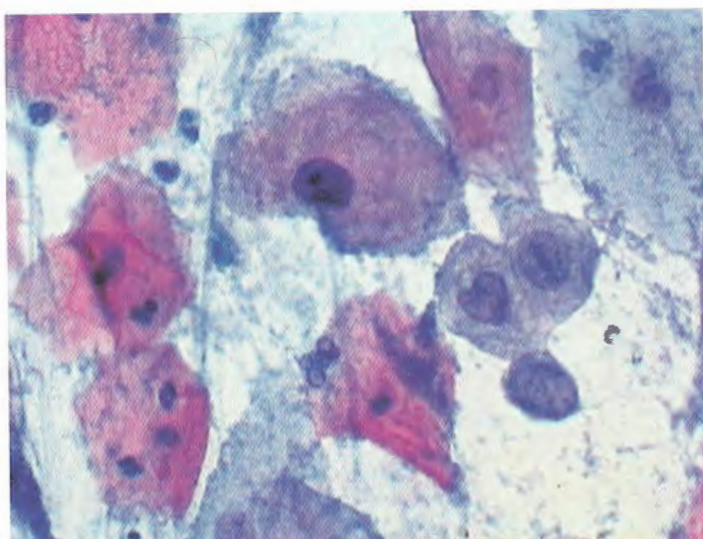



Figura 11.36 – Células com pouco citoplasma e núcleos hipercromáticos com aumento de volume.

Figura 11.37 – Agrupamento irregular de pequenas células com núcleos hipercromáticos e disposição desordenada.

LSIL - NIC I

A interpretação citológica de LSIL é mais reprodutível que de ASC, porém apresenta, ainda, 15 a 30% de probabilidade de se observar lesão de alto grau na biopsia. Essas alterações ocorrem em células epiteliais maduras (superficiais e intermediárias) (Figuras 11.38 a 11.69). Dentre as características citológicas, observam-se células de citoplasma com contorno bem-definido e abundante, isoladas ou em lâminas, com aumento nuclear maior ou igual a 3 vezes, ao se comparar com o núcleo da célula intermediária normal ou o neutrófilo. Podem-se observar binucleação ou multinucleação e contorno nuclear liso ou levemente irregular. A cromatina finamente granular é distribuída uniformemente pelo núcleo. Além disso, é ligeiramente condensada, conferindo ao núcleo leve hipercromatismo. A figura patognomônica, representando o efeito citopático do vírus, é o coilócito, que, por definição, é uma célula madura com grande halo perinuclear de contornos acentuados, com periferia do citoplasma apresentando orla densa (Figuras 11.39, 11.41, 11.43, 11.46, 11.50 a 11.53, 11.64 a 11.66 e 11.69). O termo coilocitose, que significa cavitação, erosão e cratera, foi introduzido por Koss e Durfee, em 1956, e posteriormente foi feita a conexão entre essa morfologia e a presença do HPV na célula[2].

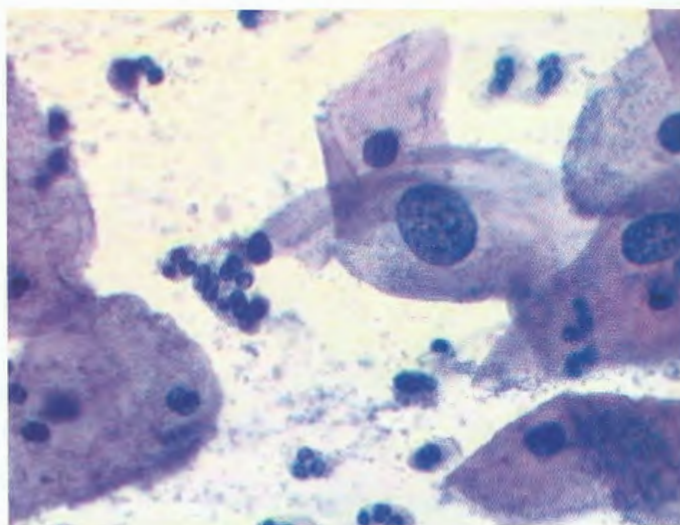



Figura 11.38 – Duas células intermediárias cobertas por bactérias com aumento nuclear, discariose, hipercromatismo nuclear e cromatina em grumos.

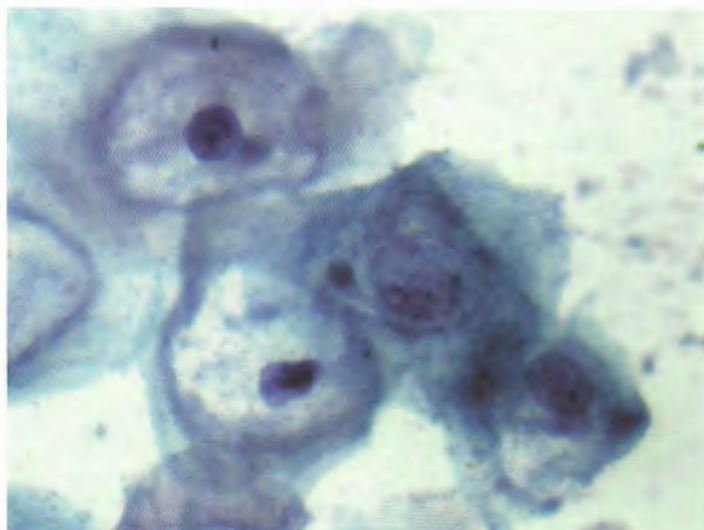



Figura 11.39 – Células planas discretamente dicarióticas, podendo apresentar modificações pelo HPV.

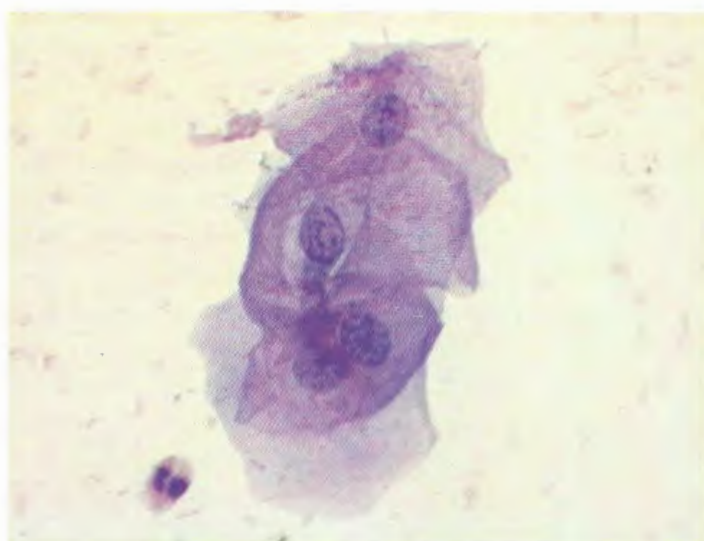



Figura 11.40 – Células intermediárias com discariose discreta, binucleação, cromatina grumosa e halo paranuclear.

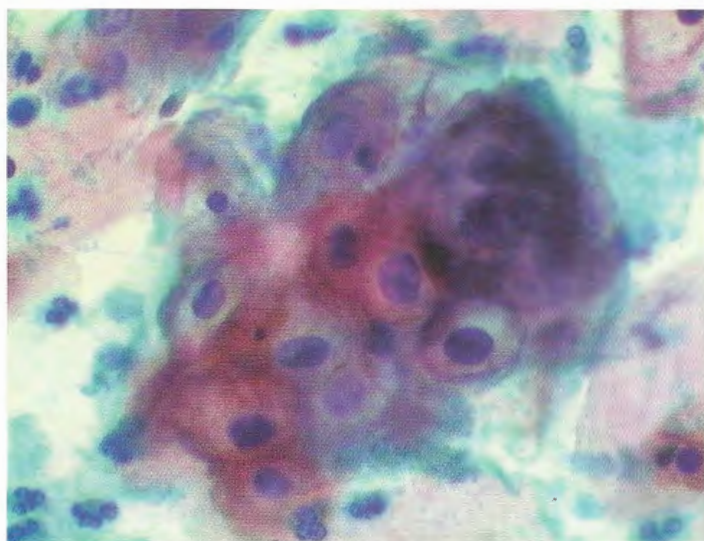



Figura 11.41 – Agrupamento celular com coilócitos e discariose.

Figura 11.42 – Células superficiais e intermediárias com discariose, coilócitos e queratinização do citoplasma.

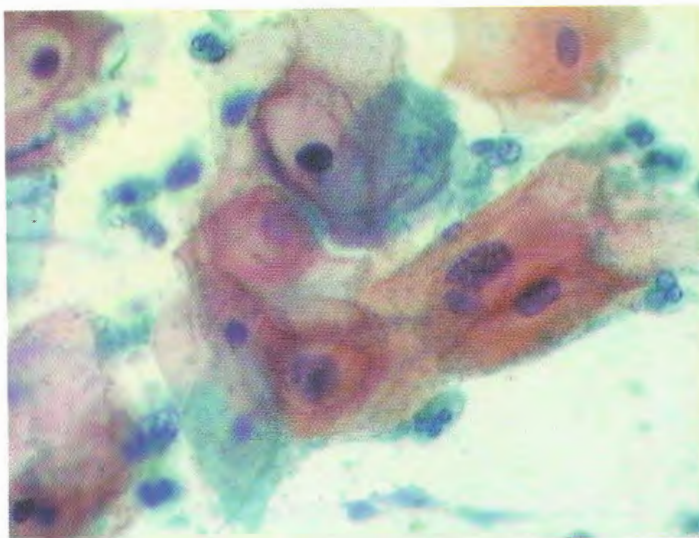



Figura 11.43 – Células com discreta discariose, multinucleação, hipercromasia e coilócitos.

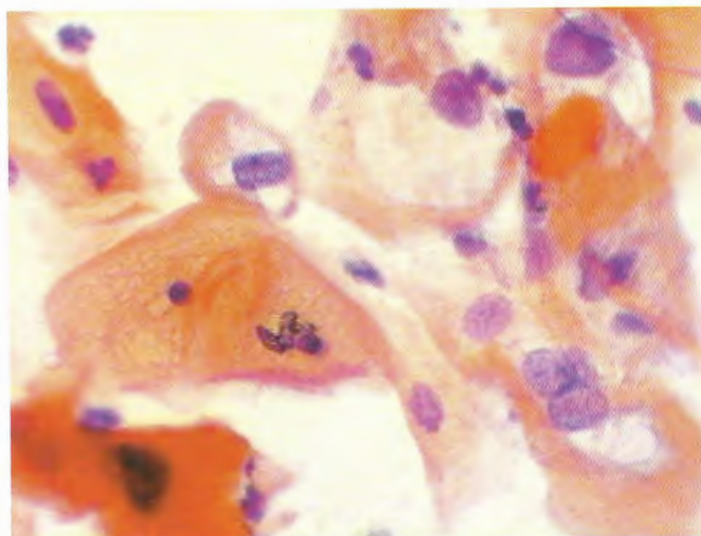



Figura 11.44 – Células superficiais e intermediárias com discariose, coilócitos e queratinização do citoplasma.

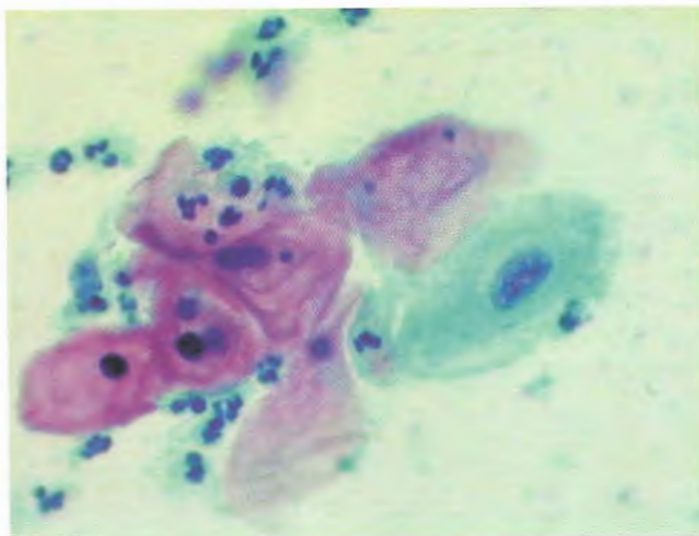
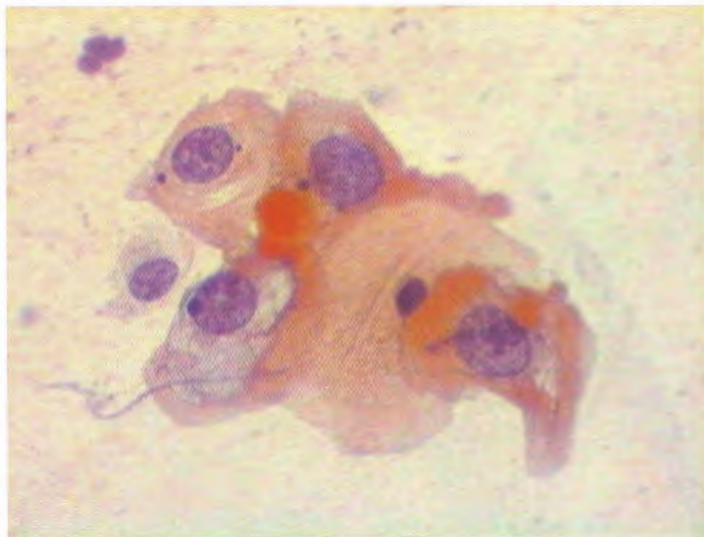



Figura 11.45 – Células planas com cariomegalia, cromatina em grumos e coilócito.

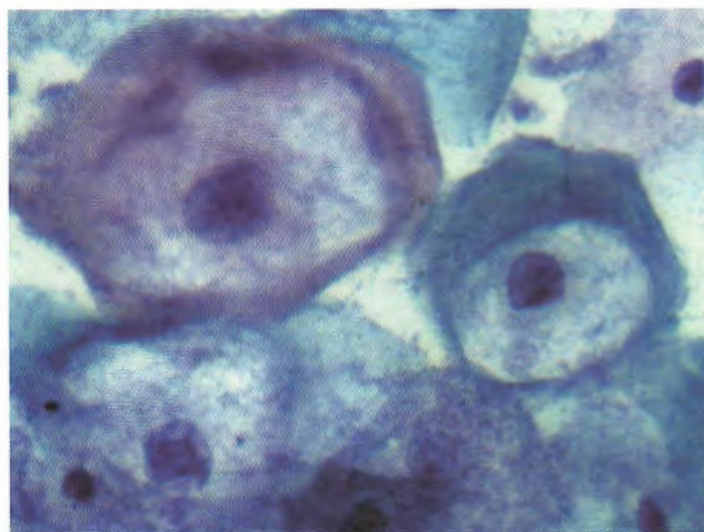



Figura 11.46 – Células com discreta discariose, hipercromasia e coilócitos.

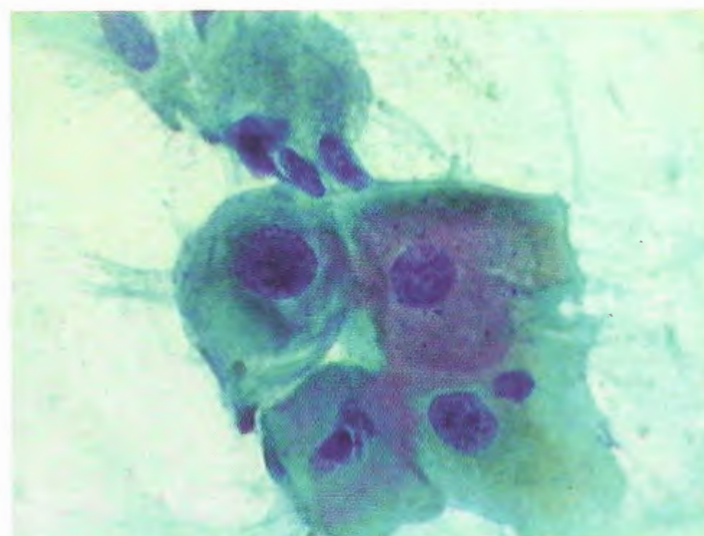



Figura 11.47 – Células com alteração discreta na relação núcleo/citoplasma, hipercromasia e cromatina grumosa.

Figura 11.48 – Agrupamento de células com discariose, hipercromatismo e irregularidade de contorno nuclear.

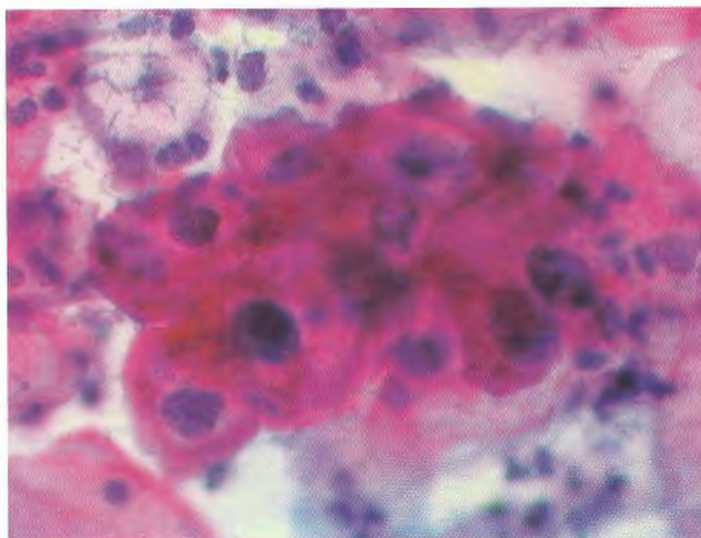



Figura 11.49 – Células com núcleos maiores que 3 vezes o núcleo das células intermediárias normais.

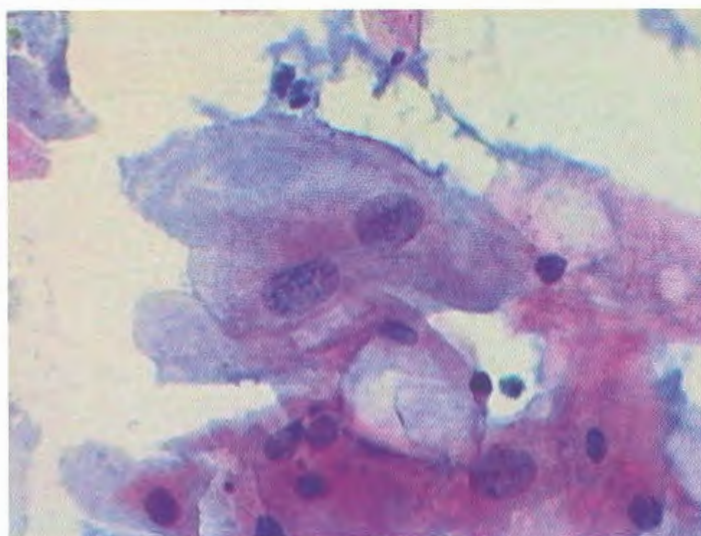



Figura 11.50 – Célula binucleada com coilócito e hipercromatismo nuclear.

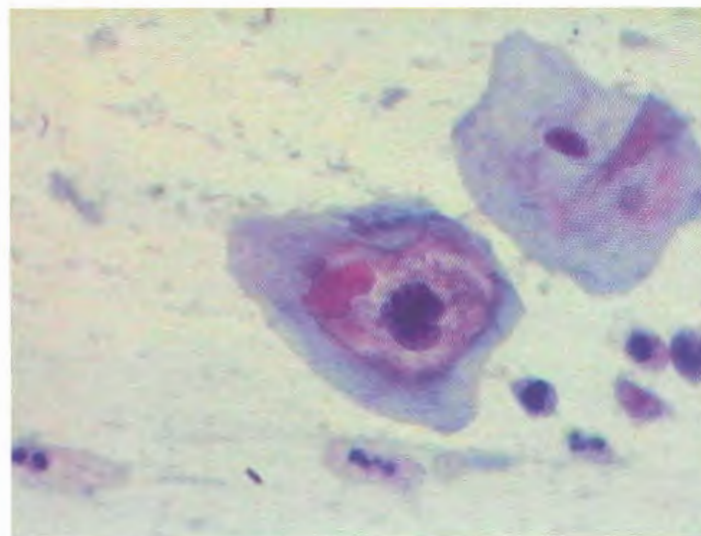



Figura 11.51 – Células dicarióticas multinucleadas e binucleadas com coilócitos.

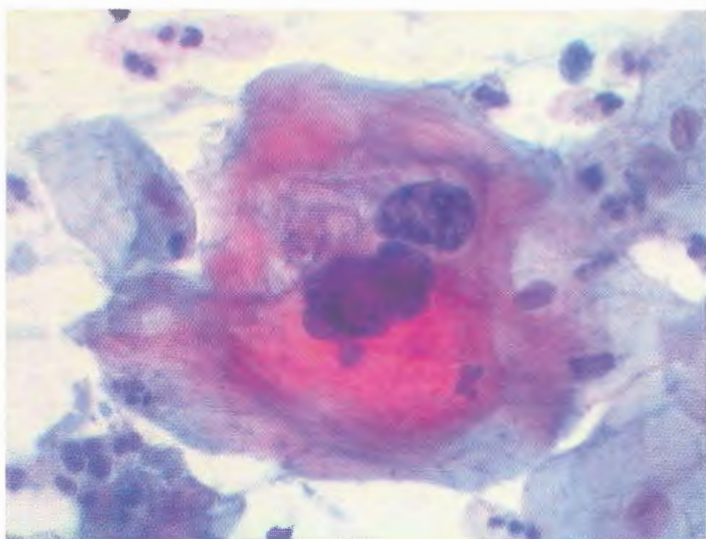



Figura 11.52 – Célula multinucleada com hipercromatismo nuclear, cromatina grumosa e coilócito.

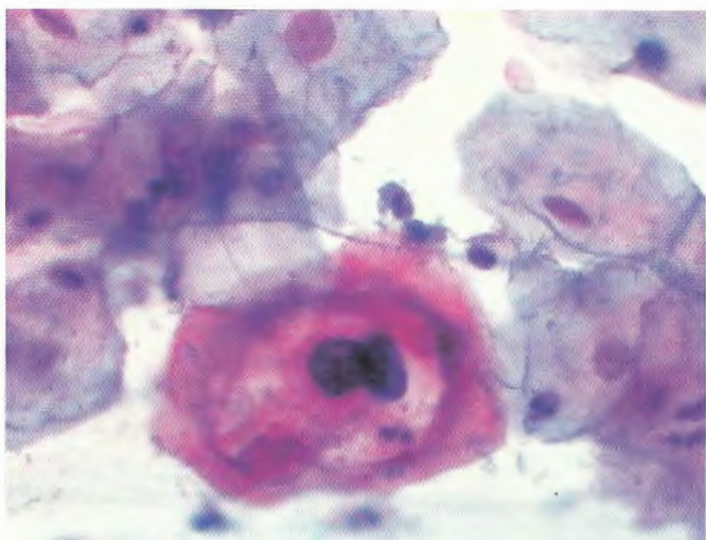



Figura 11.53 – Célula binucleada com hipercromatismo nuclear e coilócito.

Figura 11.54 – Célula multinucleada e mononucleada com cariomegalia.

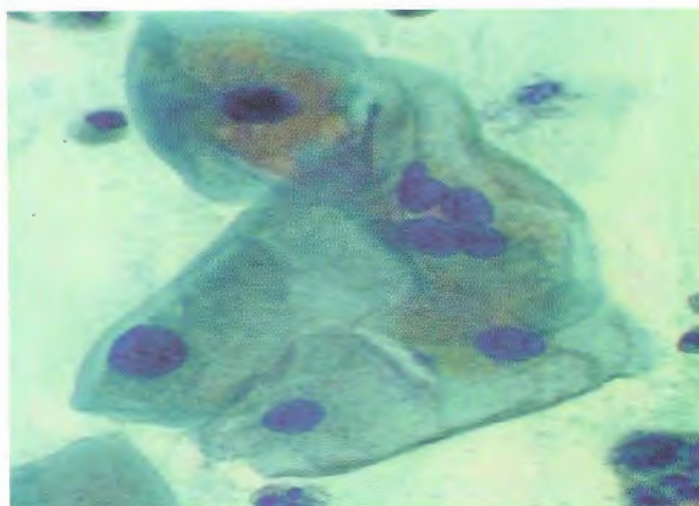



Figura 11.55 – Três células intermediárias com cariomegalia, cromatina granular, leve alteração na relação núcleo/citoplasma e halo paranuclear.

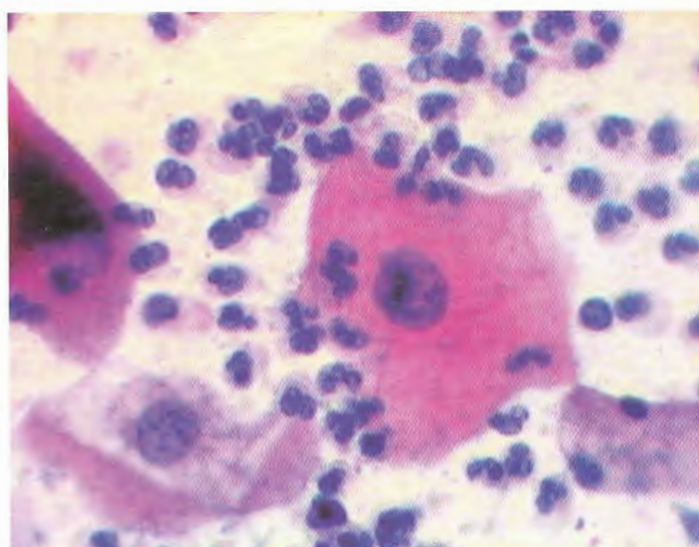



Figura 11.56 – Célula com grande aumento nuclear, de contorno liso.

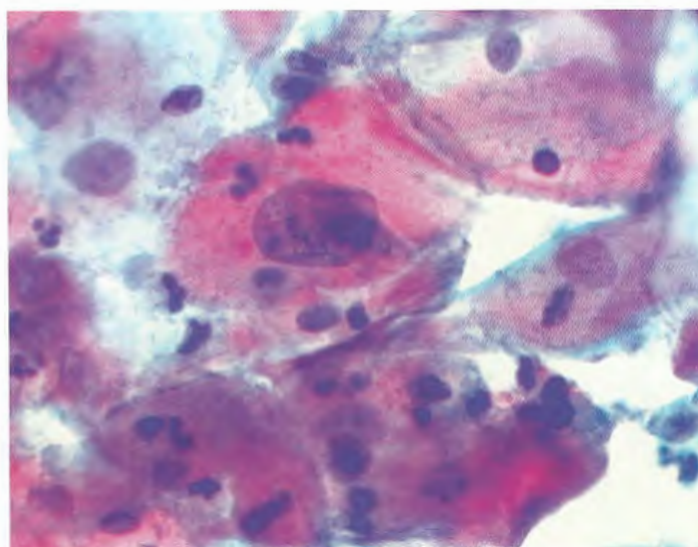
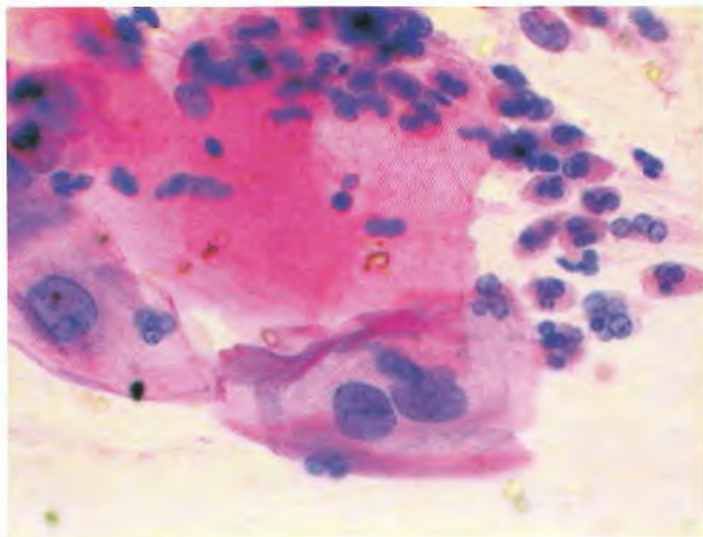



Figura 11.57 – Células com cariomegalia, cromatina granular e espessamento da membrana nuclear.

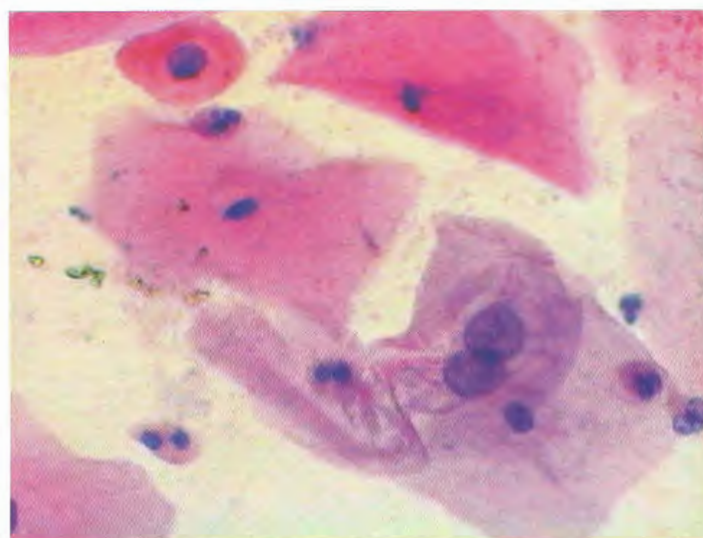



Figura 11.58 – Célula binucleada com hipercromatismo e membrana nuclear levemente espessada.

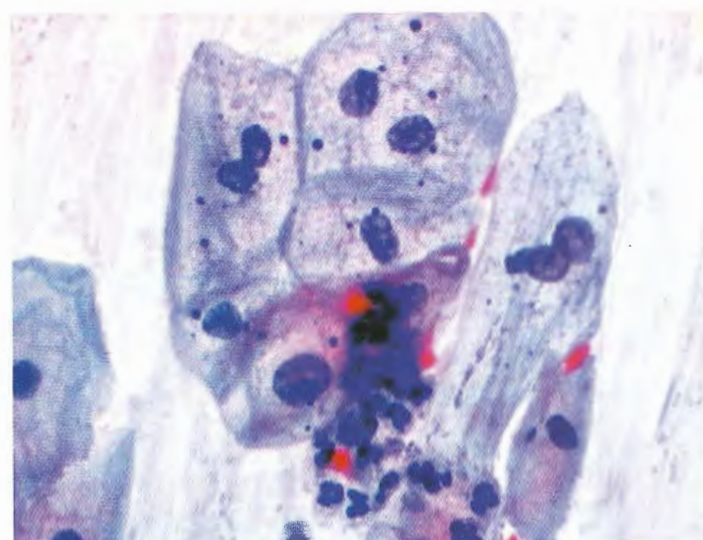



Figura 11.59 – Grupo de células intermediárias com binucleações, hipercromasia nuclear e discretos halos coilocitóticos.

Figura 11.60 – Multinucleação, alteração na relação núcleo/citoplasma e cromatina granular.

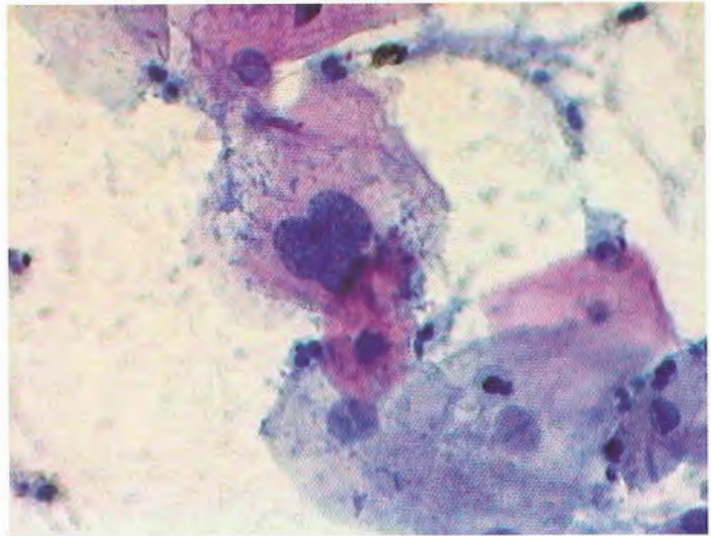



Figura 11.61 – Grupo de células intermediárias com cariomegalia, hipercromatismo nuclear, leve irregularidade de membrana e coilócitos.

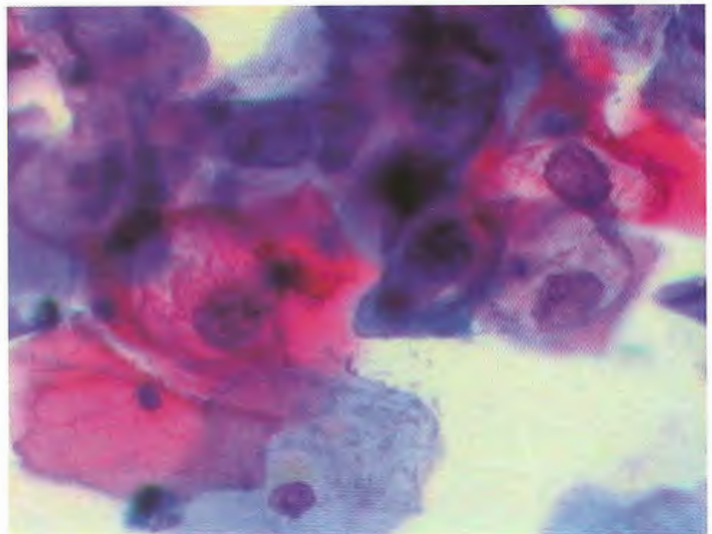



Figura 11.62 – Célula binucleada com hipercromatismo nuclear e esboço de halo coilocitótico.

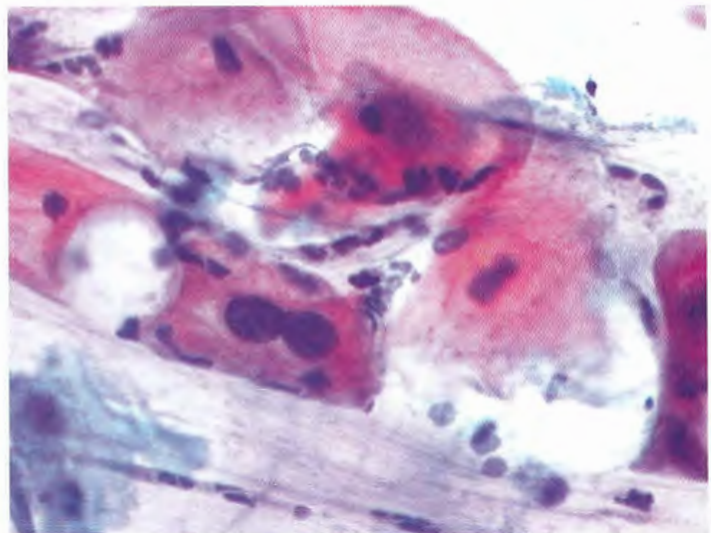
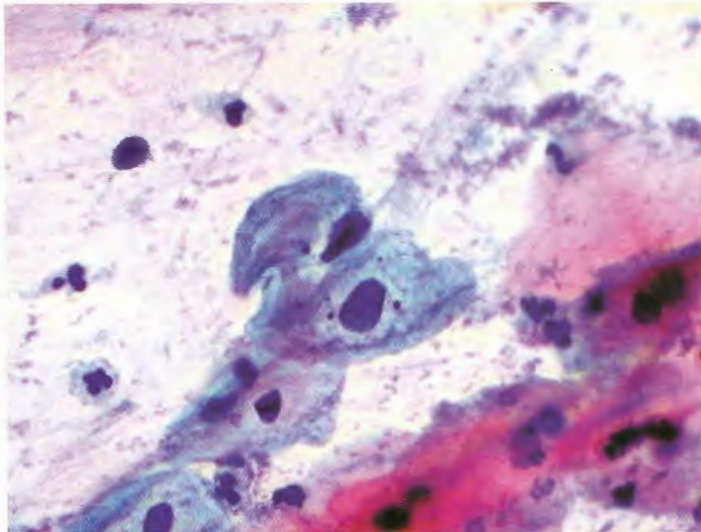



Figura 11.63 – Células intermediárias com hipercromatismo nuclear, leve irregularidade de membrana e halos coilocitóticos.

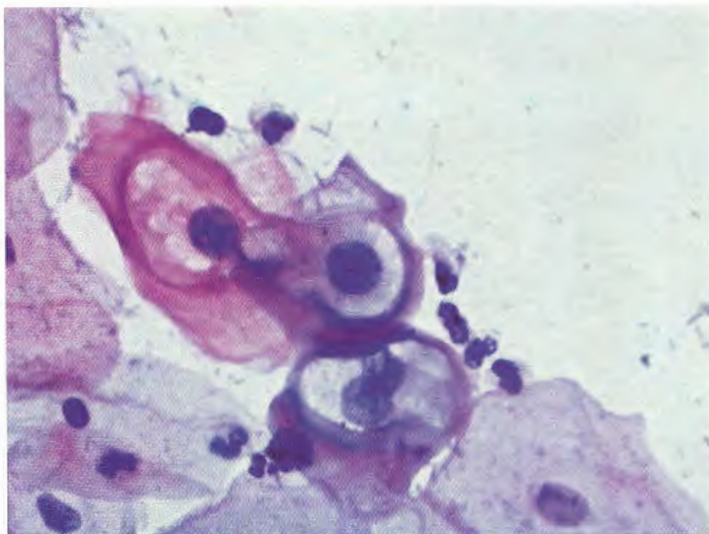



Figura 11.64 – Coilócitos.

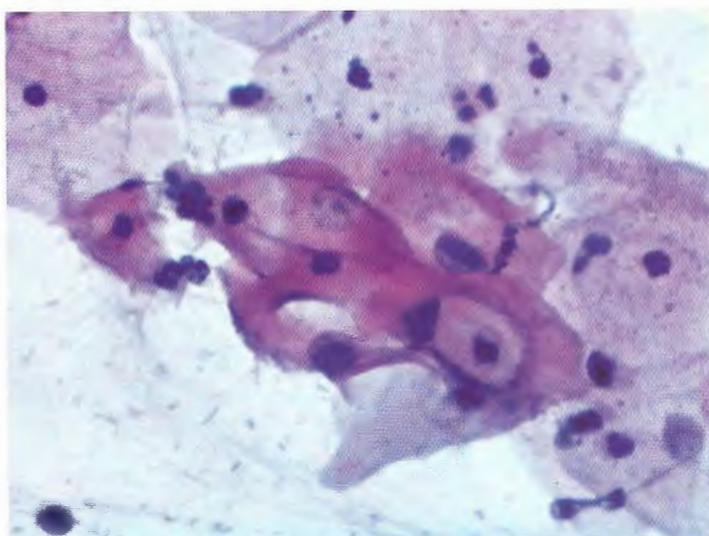



Figura 11.65 – Núcleos aumentados envoltos por coilócitos.

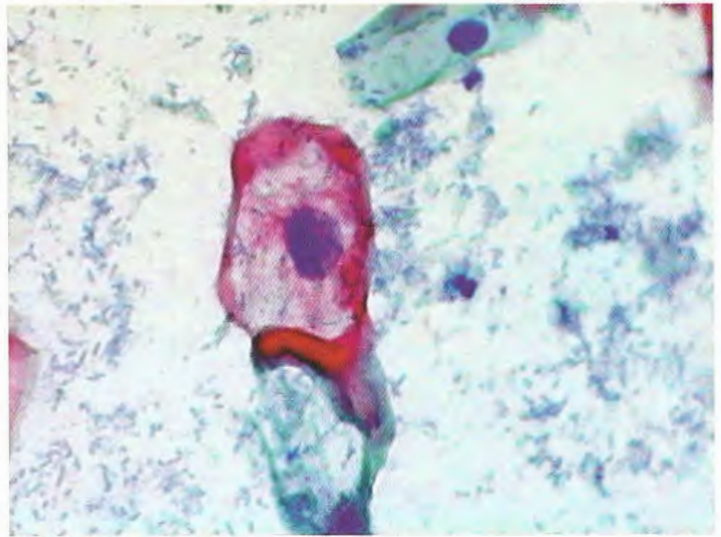



Figura 11.66 – Núcleo aumentado envolto por coilócito.

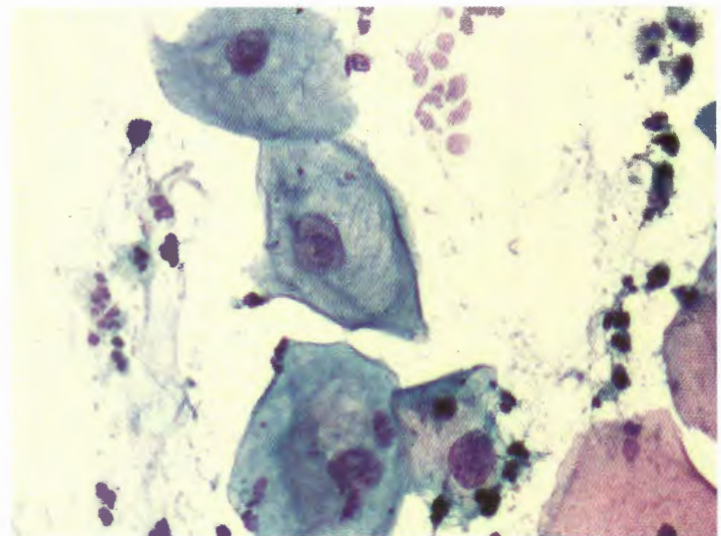



Figura 11.67 – Células com halos paranucleares, cariomegalia e membrana nuclear espessada.

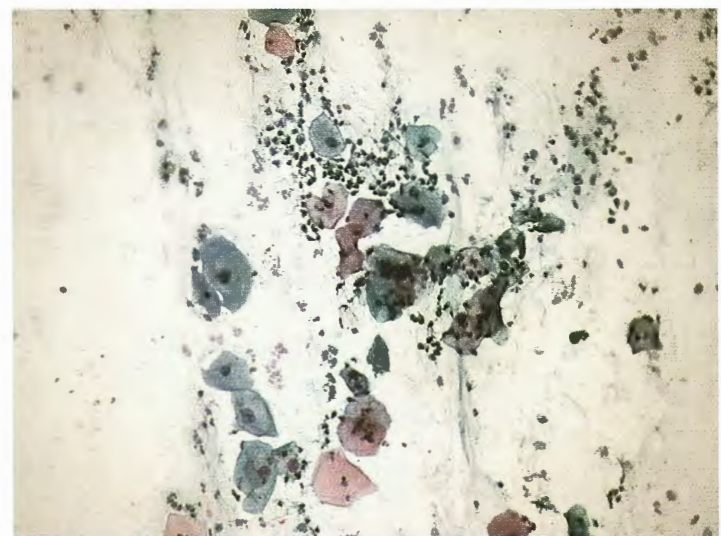



Figura 11.68 – Células no canto esquerdo inferior com aumento nuclear, hipercromasia e halos paranucleares.

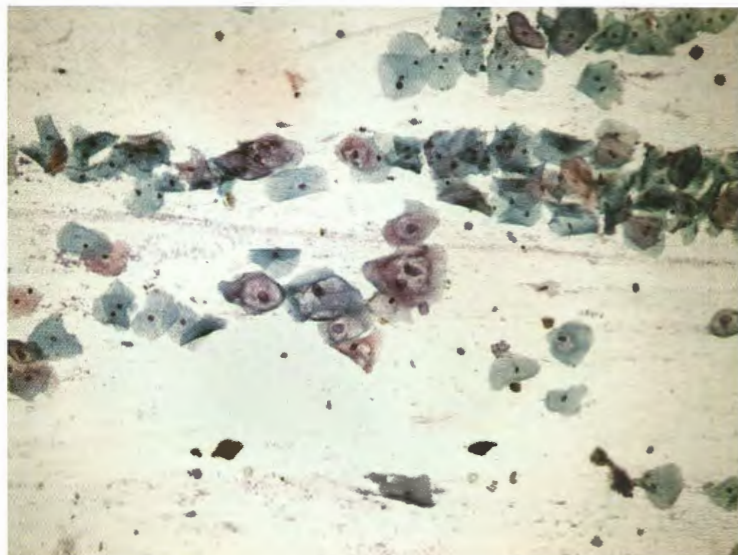



Figura 11.69 – Muitas células com coilócitos evidentes.

Entretanto, como diagnósticos diferenciais, observam-se células que apresentam halos inflamatórios, pois também são comuns nas infecções por *Candida* spp. e *Trichomonas vaginalis*. Em mulheres na perimenopausa, pode-se observar pseudocoilocitose, além da deficiência de ácido fólico, que pode causar núcleo hipercromático e multinucleações e aumento de volume do núcleo e do citoplasma, mas com a relação núcleo/citoplasma mantida. A pseudocoilocitose também é observada em mulheres grávidas, em alcoólatras e em indivíduos que fazem uso de alguns medicamentos.

HSIL – NIC II OU NIC III

As alterações ocorrem em células epiteliais imaturas, tais como as parabasais, as basais e as metaplásicas. Nas Figuras 11.70 a 11.79, podem-se observar fenótipos celulares referentes à NIC II, já nas Figuras 11.80 a 11.94, NIC III. As características citológicas incluem a apresentação de citoplasma denso arredondado, ovalado ou irregular em células isoladas, dispostas em lâminas ou agrupamentos sinciciais. O aumento da relação núcleo/citoplasma, além da variação no formato

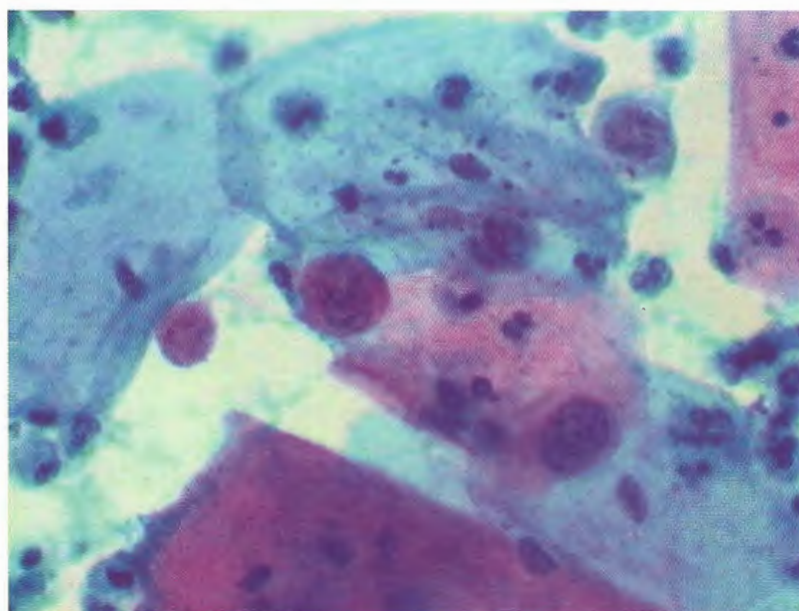



Figura 11.70 – Células imaturas apresentando discariose moderada, com marcante hipercromatismo, indentações e alteração na relação núcleo/citoplasma.

Figura 11.71 – Células moderadamente discarióticas com cromatina pálida (eucromatina) em núcleos aumentados e muito irregulares.

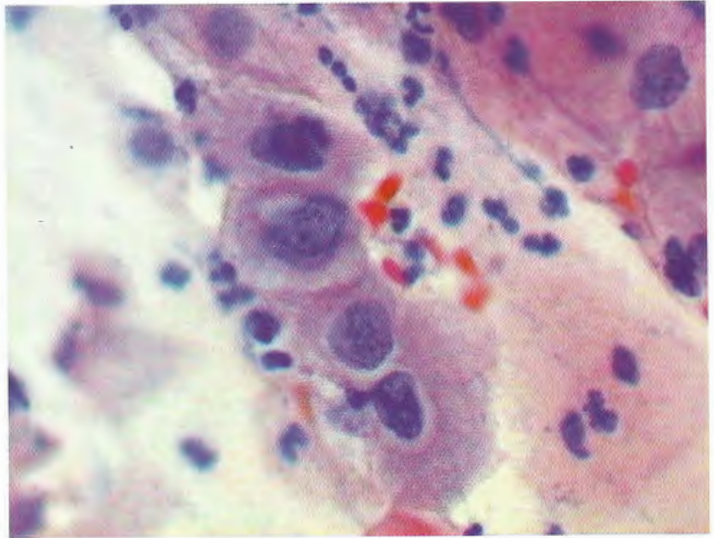



Figura 11.72 – Célula multinucleada com núcleos hipercromáticos irregulares, ocupando mais da metade do citoplasma.

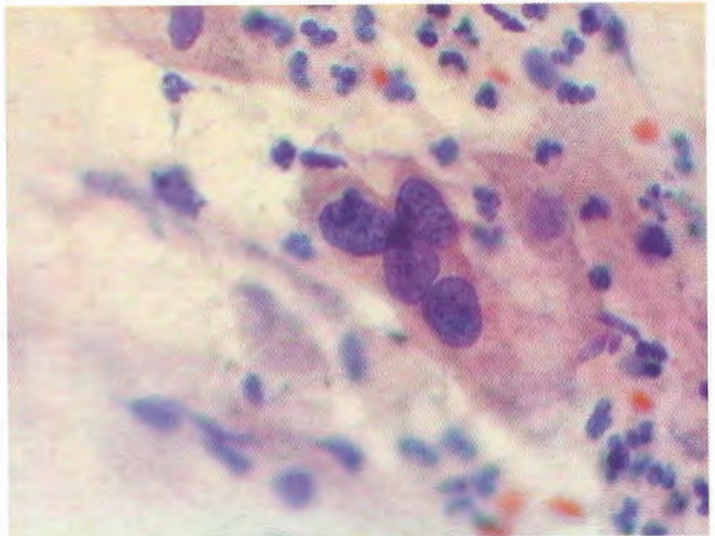



Figura 11.73 – Células parabasais com discariose moderada (aumento nuclear de 2 a 3 vezes o tamanho da célula, núcleo hipercromático e irregular).

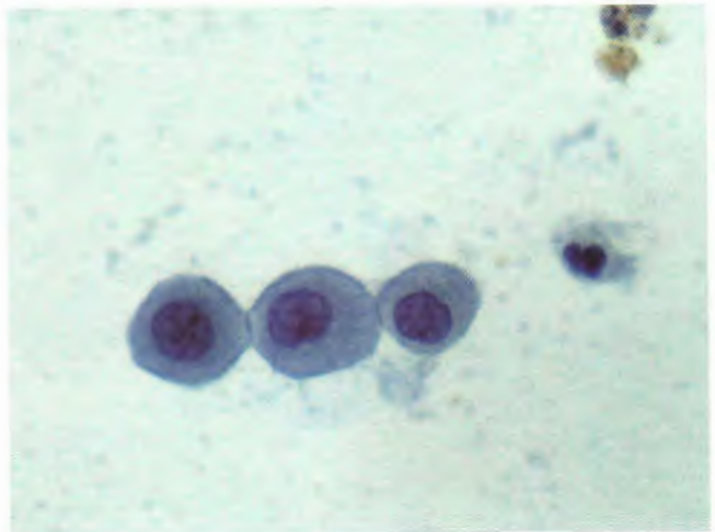
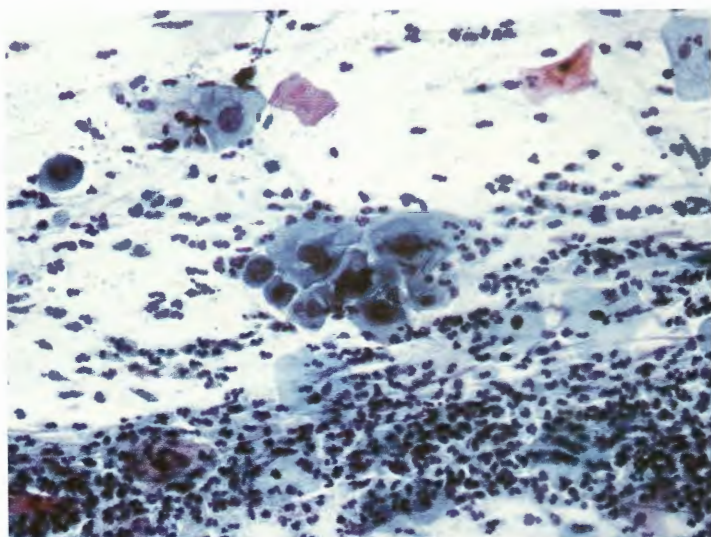



Figura 11.74 – Células moderadamente discarióticas, com núcleos irregulares, aumentados e hipercromáticos.

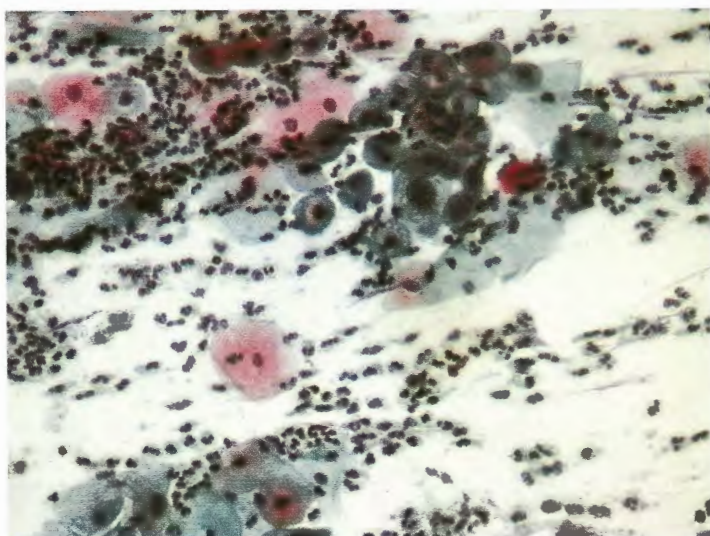



Figura 11.75 – Células moderadamente discarióticas com coilocitose.

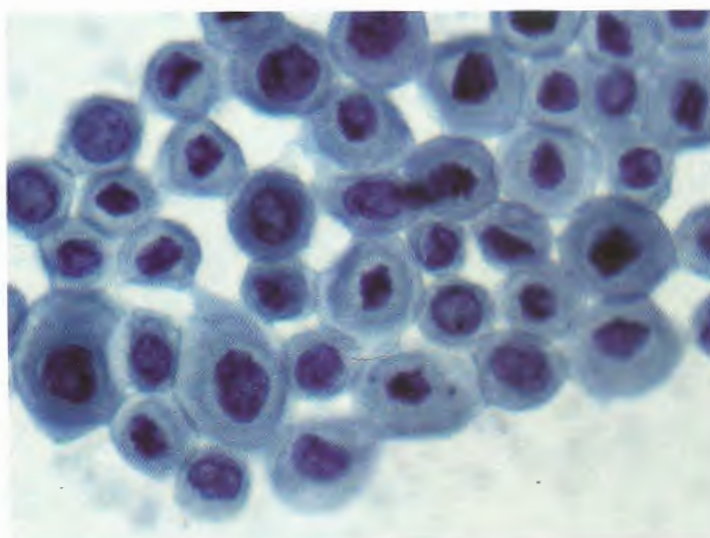



Figura 11.76 – Células parabasais com discariose moderada, hipercromatismo marcante, indentações e alteração na relação núcleo/citoplasma.

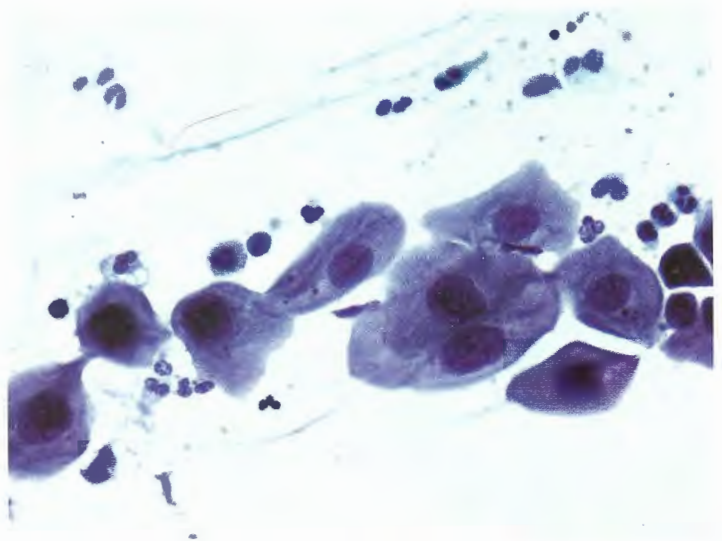



Figura 11.77 – Células metaplásicas moderadamente discarióticas.

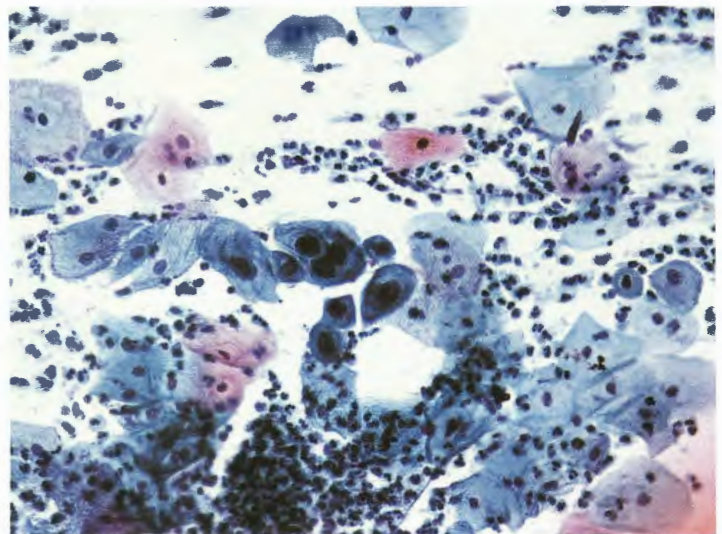



Figura 11.78 – Células metaplásicas com hipercromatismo, núcleo irregular e aumentado.

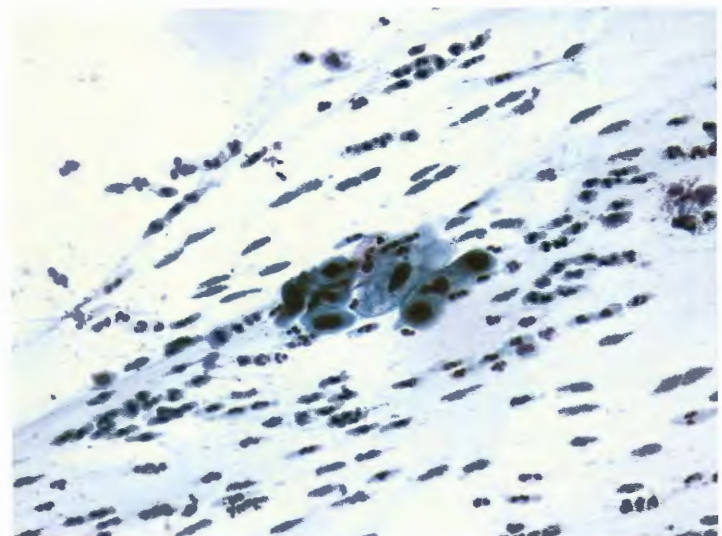



Figura 11.79 – Células metaplásicas moderadamente discarióticas.

e no tamanho nucleares, apresentando cromatina fina ou grosseira, confere ao núcleo hipercromatismo e nucléolos pequenos. A membrana nuclear é irregular e espessada. A "fila indiana" pode ocorrer no carcinoma *in situ* (Figuras 11.95 e 11.101). Como diagnósticos diferenciais, incluem-se as células endocervicais degeneradas (núcleos nus com anisocariose), além da hiperplasia de células de reserva, onde se observam células pequenas de citoplasma escasso, e ainda na cervicite folicular, onde se observa um achado focal constituído por células linfocitárias e macrófagos, formando um quadro polimorfo.

Em função do uso de DIU, observam-se células com núcleo hipercrômico, aumento da relação núcleo/citoplasma e vacuolização citoplasmática. A qualidade da fixação também pode gerar dificuldade diagnóstica.

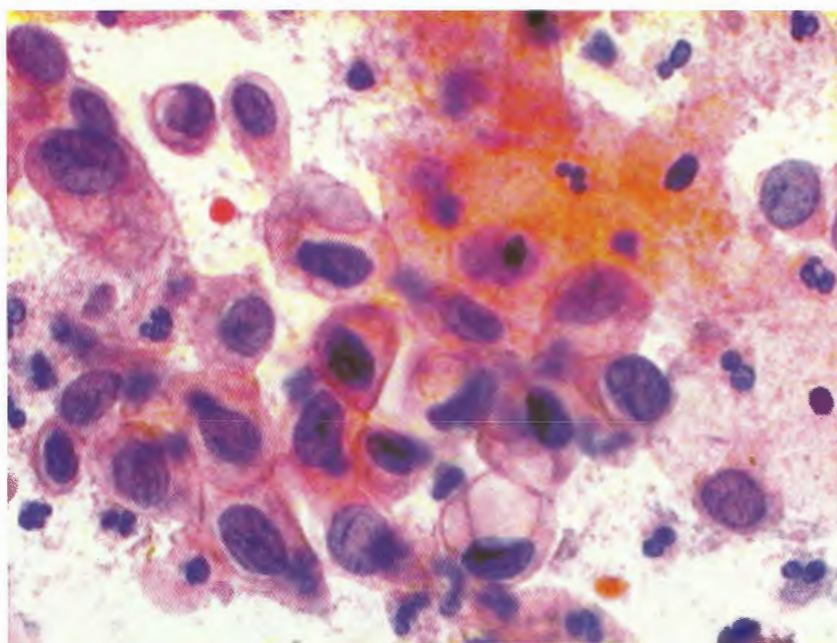



Figura 11.80 – Células intensamente discarióticas, algumas com citoplasma escasso, núcleo hipercromático e muito irregular.

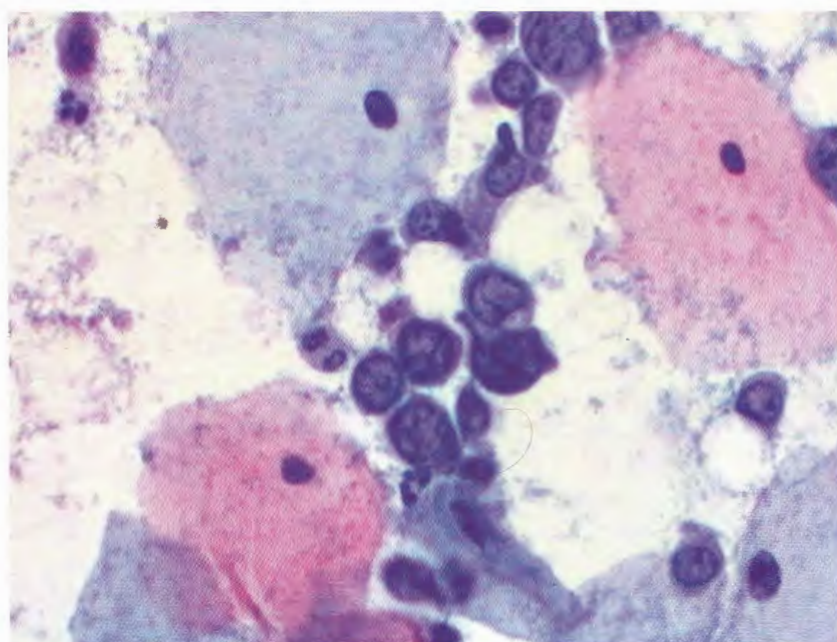



Figura 11.81 – Células pequenas intensamente discarióticas, quase sem citoplasma, membrana nuclear irregular e espessada.

Figura 11.82 – Células intensamente discarióticas, algumas com citoplasma escasso, núcleo hipercromático e muito irregular.

Figura 11.83 – Discariose grave com algumas células muito pequenas, com núcleos hipercromáticos e irregulares.

Figura 11.84 – Diversas células intensamente discarióticas com vários tamanhos.

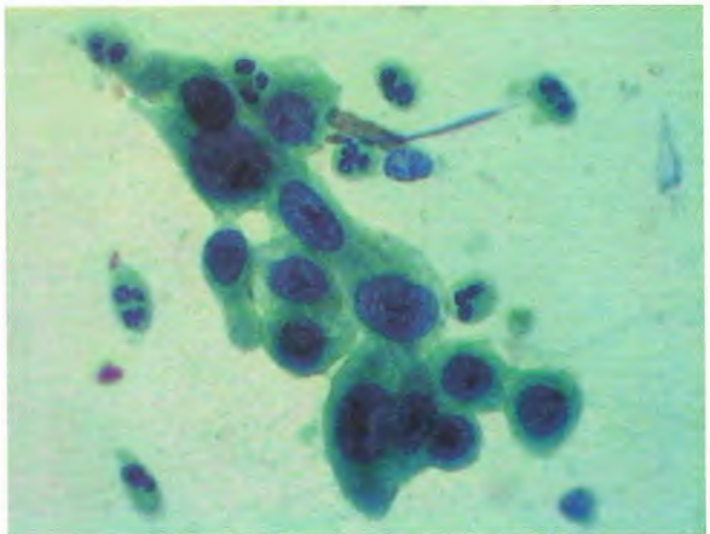
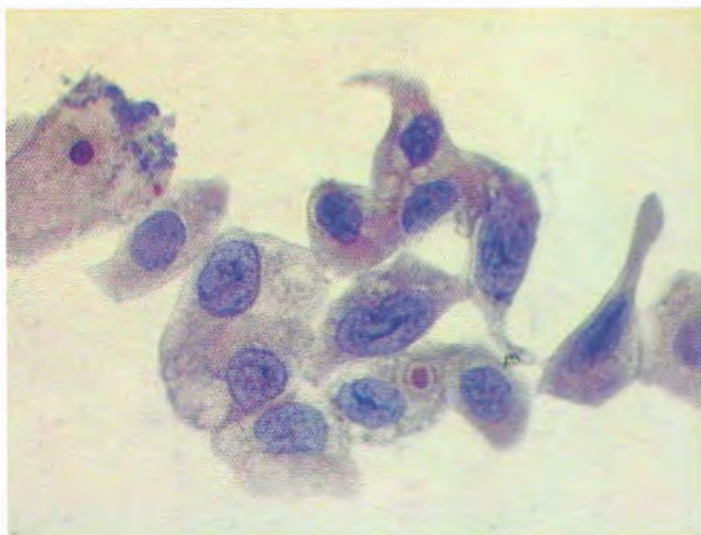



Figura 11.85 – As células, neste campo, são grandes, com núcleos de vários tamanhos.

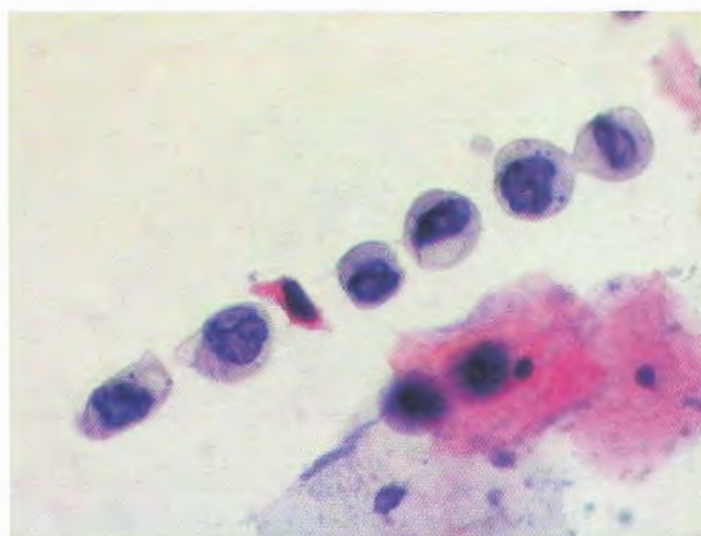



Figura 11.86 – Células intensamente discarióticas, dispostas em "fila indiana".

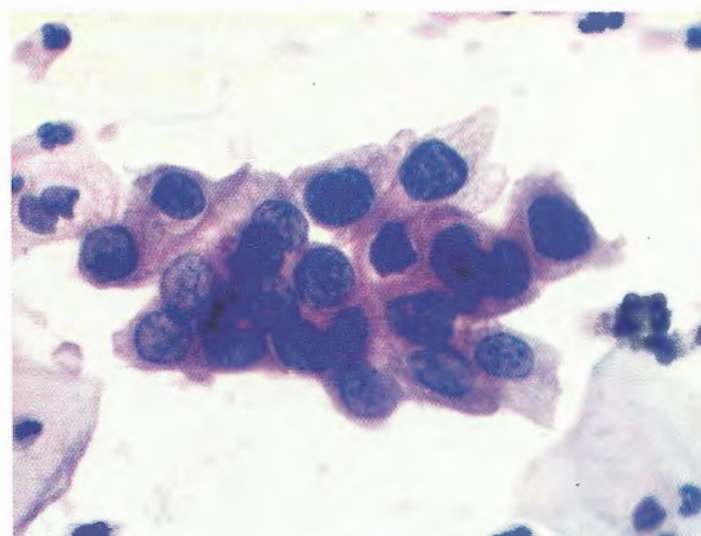



Figura 11.87 – Agrupamento de células intensamente discarióticas, algumas com citoplasma escasso, núcleo hipercromático e irregular.

Figura 11.88 – Diversas células intensamente discarióticas com vários tamanhos.

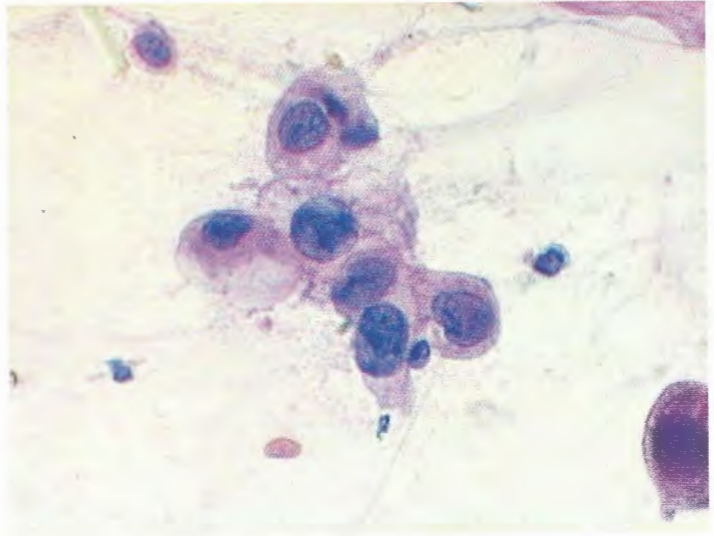



Figura 11.89 – Células com relação núcleo/citoplasma muito alta e cromatina com grumos grosseiros.

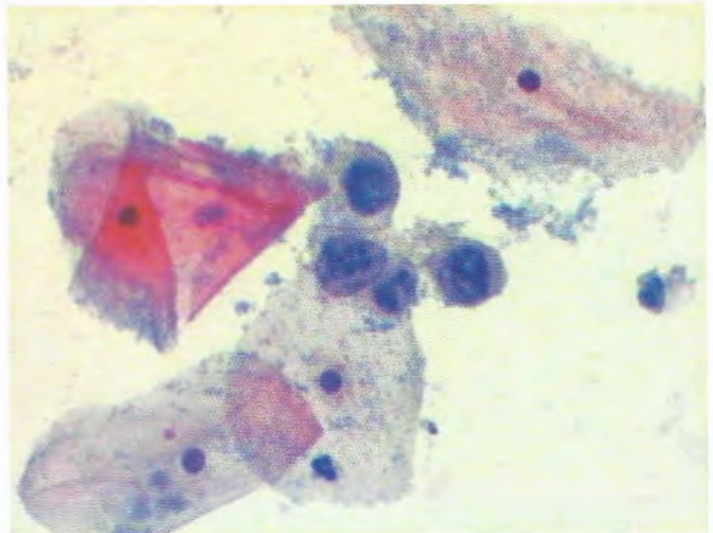



Figura 11.90 – Diversas células intensamente discarióticas com membrana nuclear irregular e espessada.

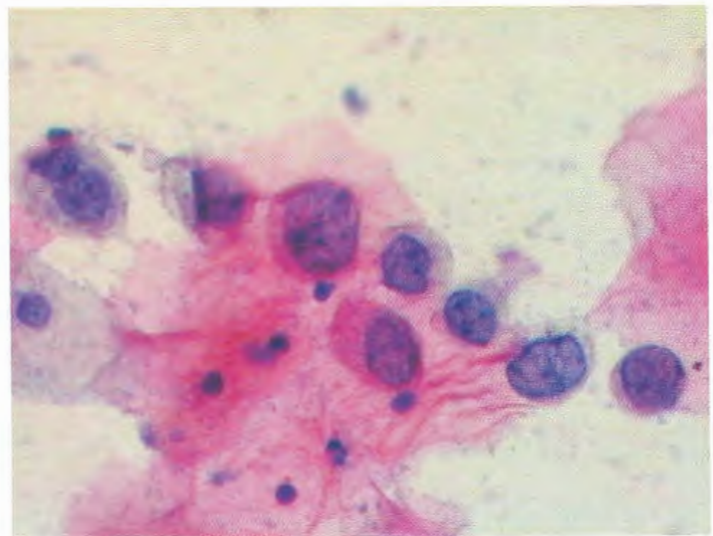
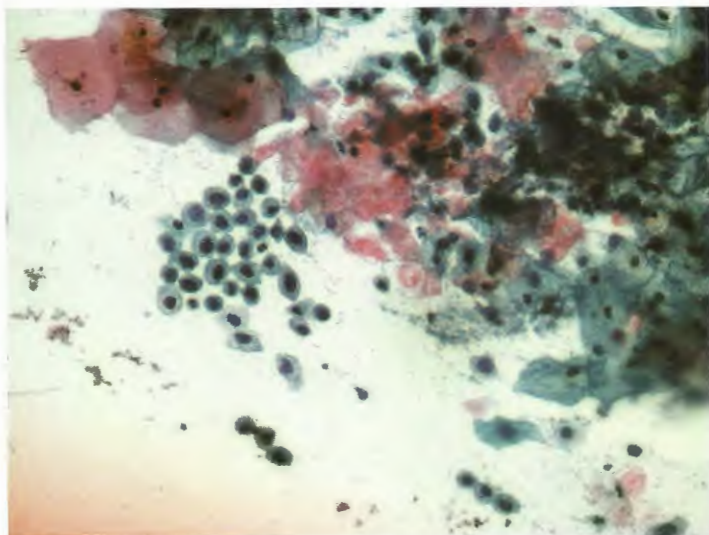



Figura 11.91 – Células pequenas intensamente discarióticas, quase sem citoplasma, com membrana nuclear irregular.

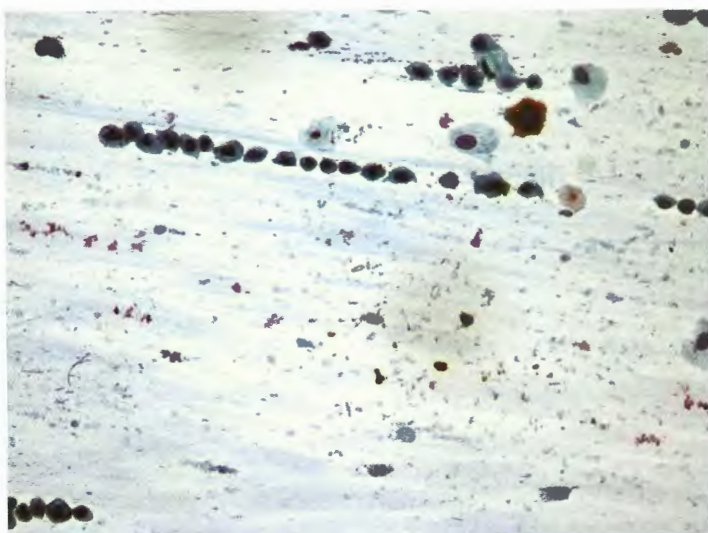



Figura 11.92 – Células pequenas intensamente discarióticas, dispostas em "fila indiana".

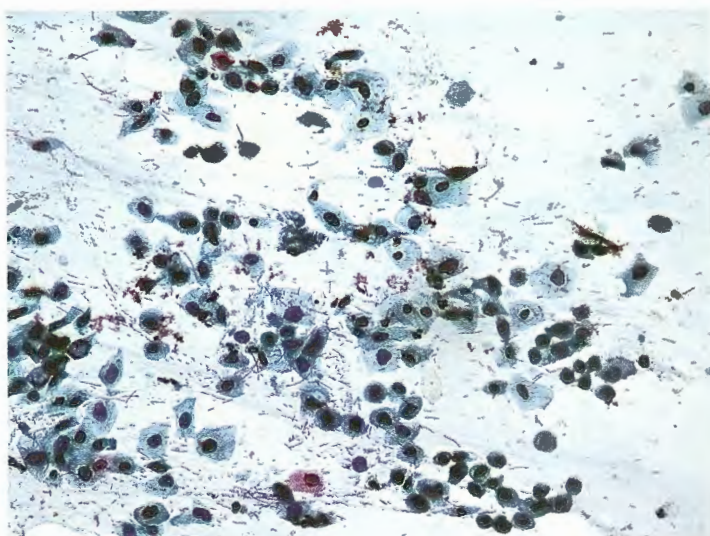



Figura 11.93 – Muitas células isoladas intensamente discarióticas.

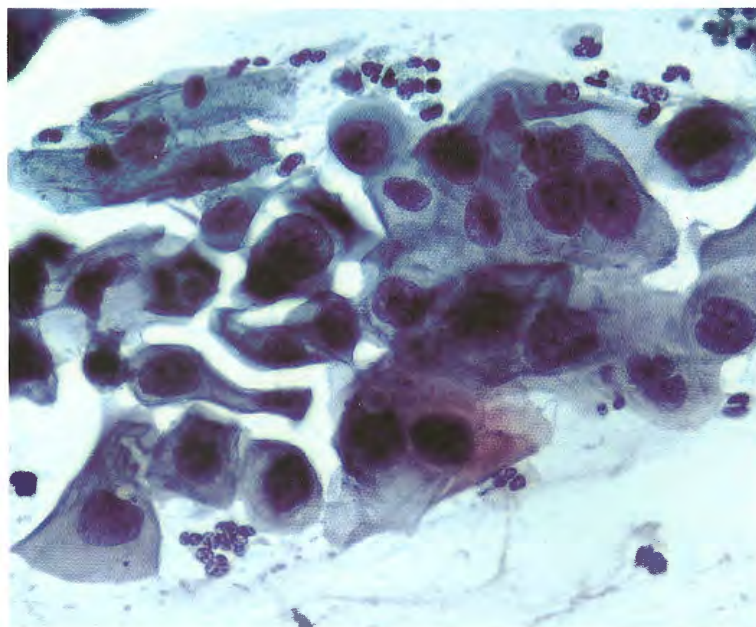



Figura 11.94 – Diversas células intensamente discarióticas com vários tamanhos e formas.

CARCINOMA INVASOR DE CÉLULAS ESCAMOSAS

É definido como neoplasia epitelial maligna do colo uterino que rompe a membrana basal, infiltra o estroma adjacente e tem capacidade de metástase. É a neoplasia maligna mais frequente do colo uterino e o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres. Dentre os tipos de carcinomas, observam-se os que se seguem.

Carcinoma queratinizante

O esfregaço apresenta muitas células neoplásicas disformes, pleomórficas, com núcleo grande ou picnótico, irregulares, e hipercrômico exibindo citoplasma eosinofílico/queratinizado bem-definido. É comum a presença de pérolas córneas e notável variação do tamanho e da forma celulares. Estão presentes células em fibra, isoladas ou em agrupamentos, além de células em girino (Figuras 11.95 a 11.108).

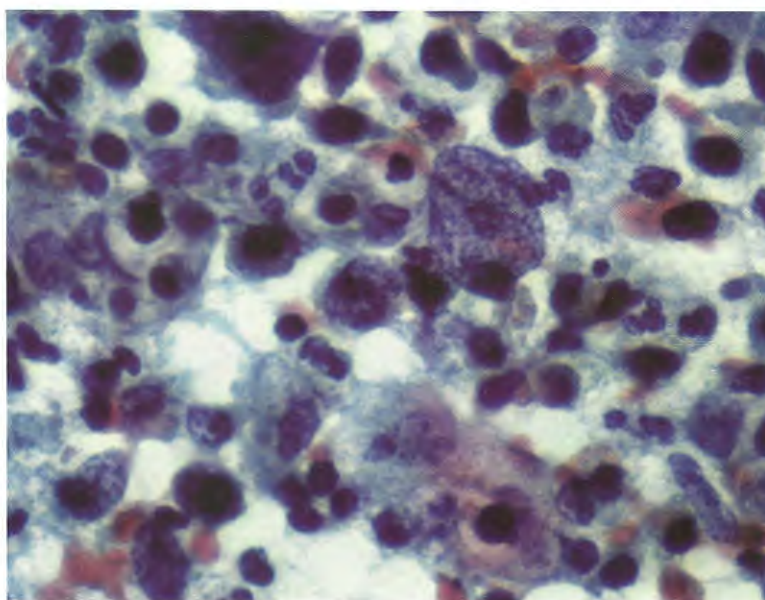



Figura 11.95 – Células escamosas seriamente discarióticas, com cromatina marcadamente anormal, e raras células com citoplasma queratinizado.

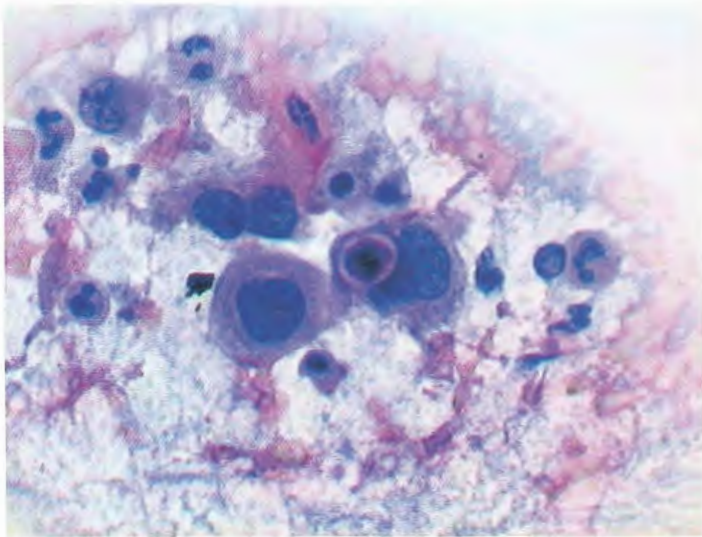



Figura 11.96 – Fundo com *debris* celulares e células atípicas com fagocitose e queratinização do citoplasma.

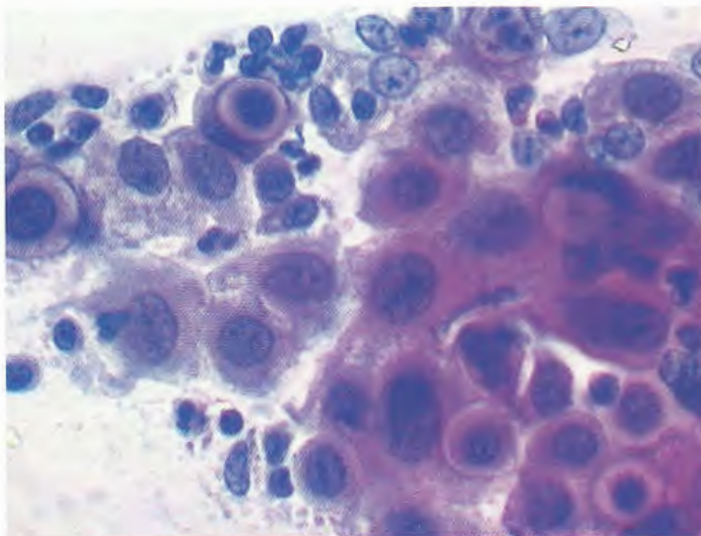



Figura 11.97 – Esfregaço hemorrágico com células intensamente discarióticas e canibalismo.

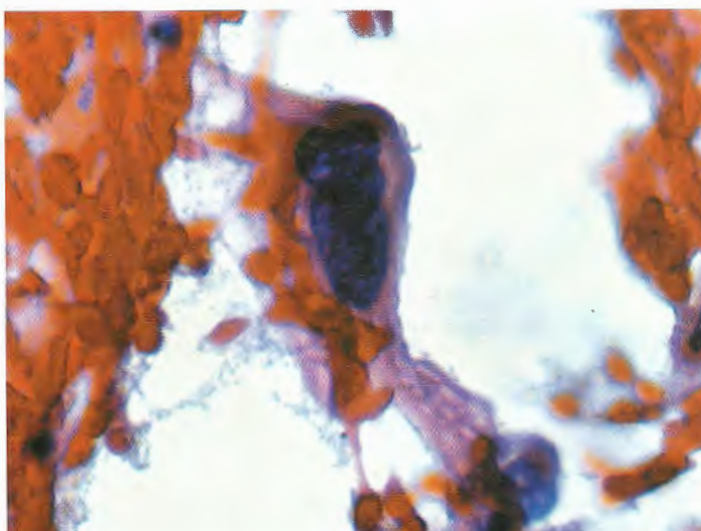



Figura 11.98 – Fundo hemorrágico com célula aberrante multinucleada de citoplasma queratinizado.

Figura 11.99 – Fundo hemorrágico com células intensamente discarióticas.

978-85-4120-024-0

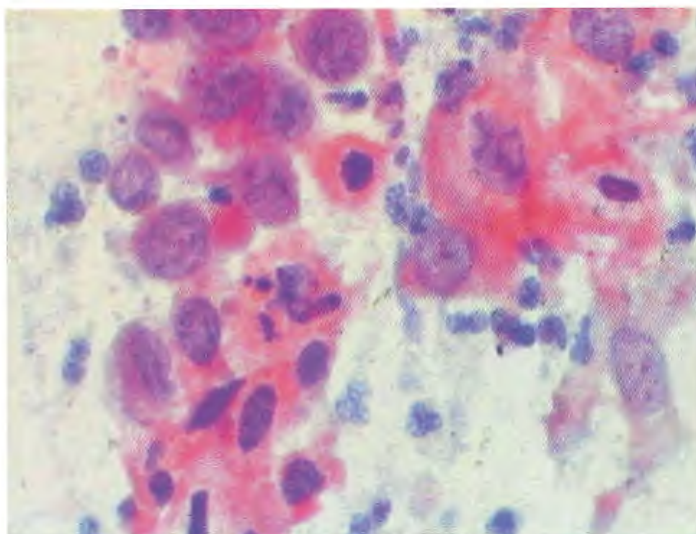



Figura 11.100 – Células pleomórficas em meio a restos celulares necróticos.

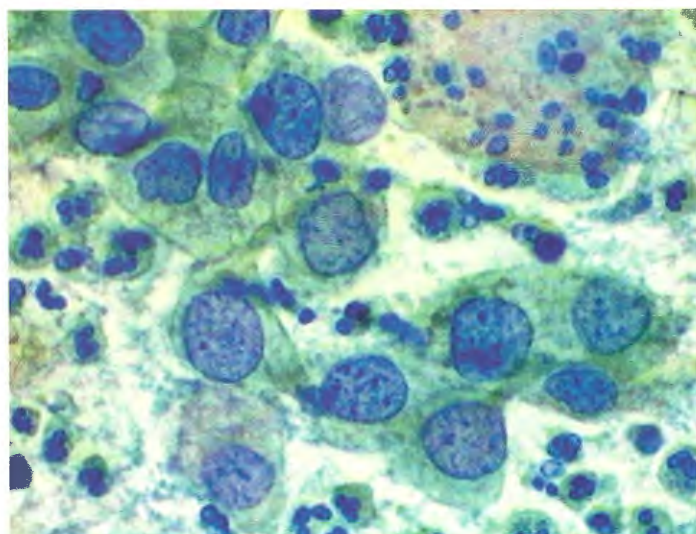



Figura 11.101 – Células carcinomatosas em fundo hemorrágico e restos celulares.

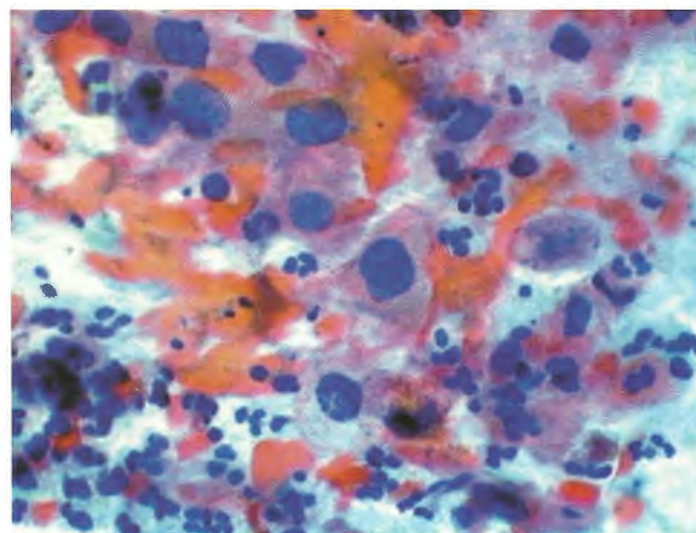
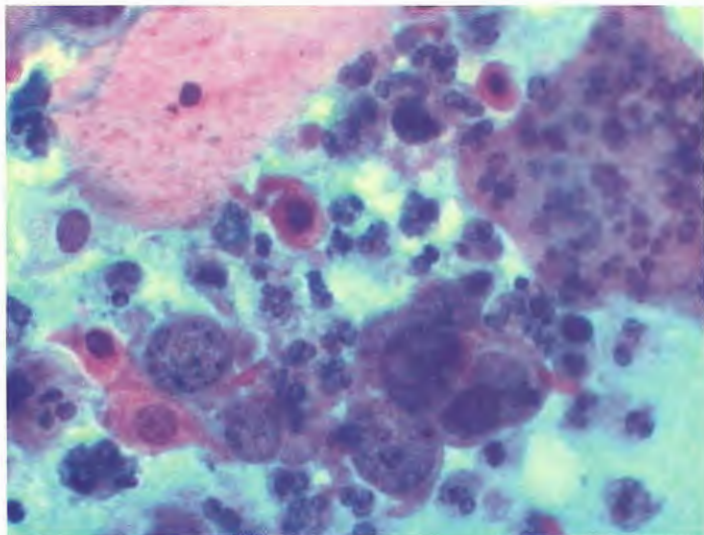



Figura 11.102 – Células pleomórficas e queratinização atípica.

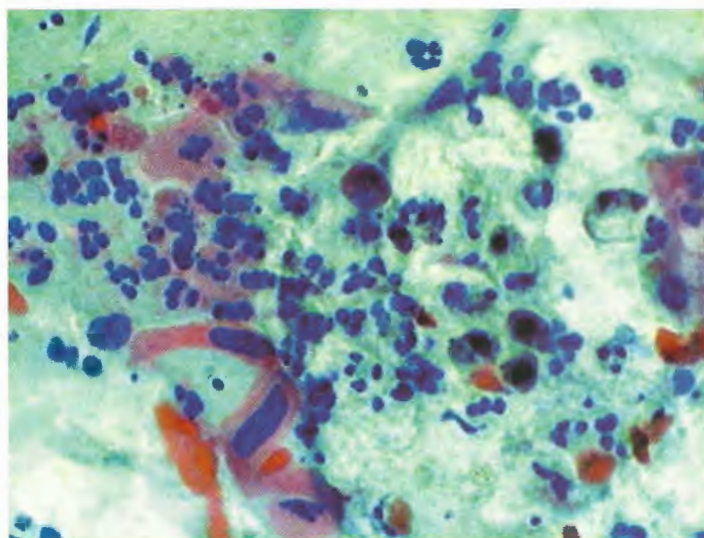



Figura 11.103 – Células pleomórficas carcinomatosas, células degeneradas com núcleo picnótico, necrose, hemácias e polimorfonucleares.

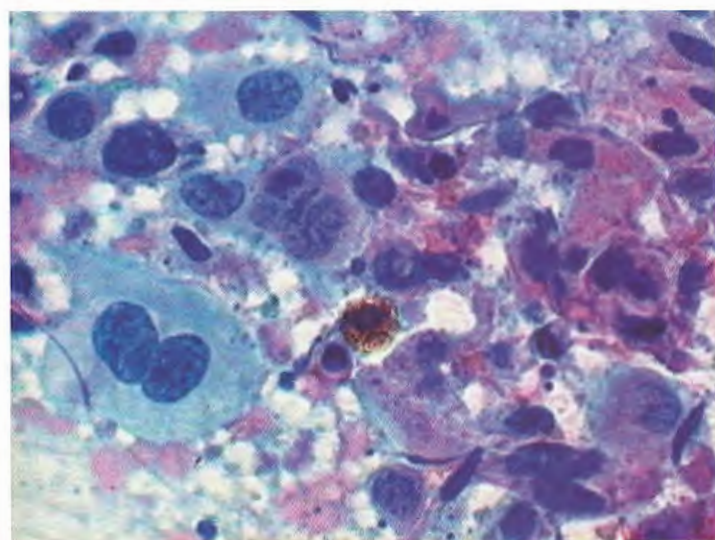



Figura 11.104 – Células pleomórficas carcinomatosas, necrose e hemácias.

Figura 11.105 – Células carcinomatosas com citoplasma queratinizado.

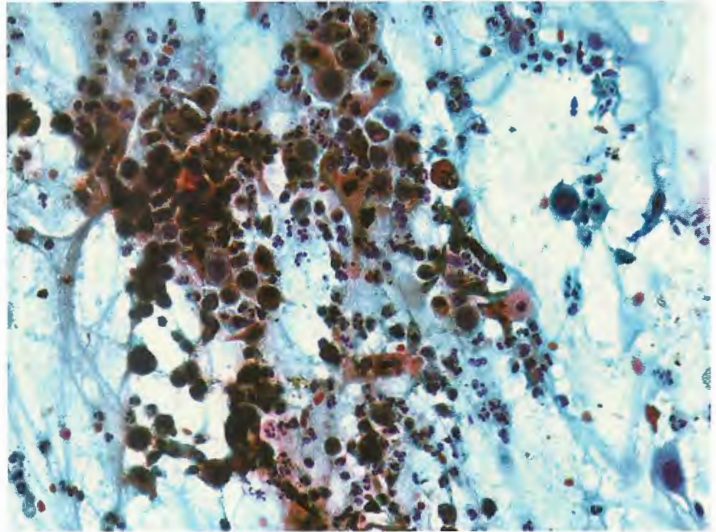



Figura 11.106 – Células pleomórficas carcinomatosas com citoplasma queratinizado, hemácias e polimorfonucleares.

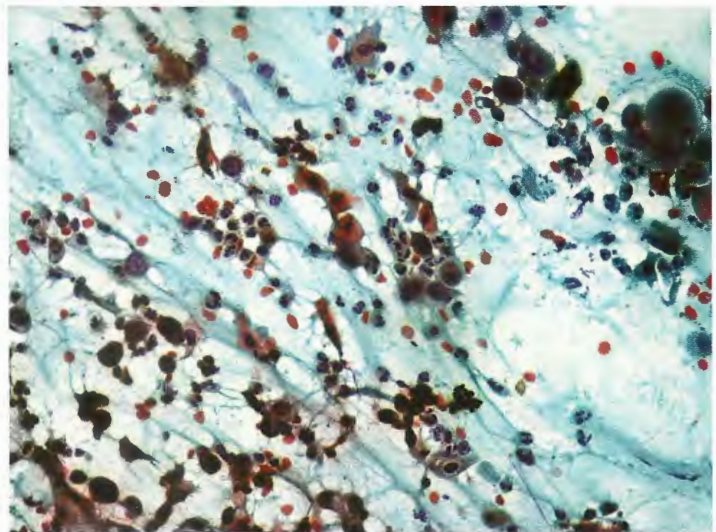



Figura 11.107 – Células escamosas seriamente discarióticas com citomegalia.

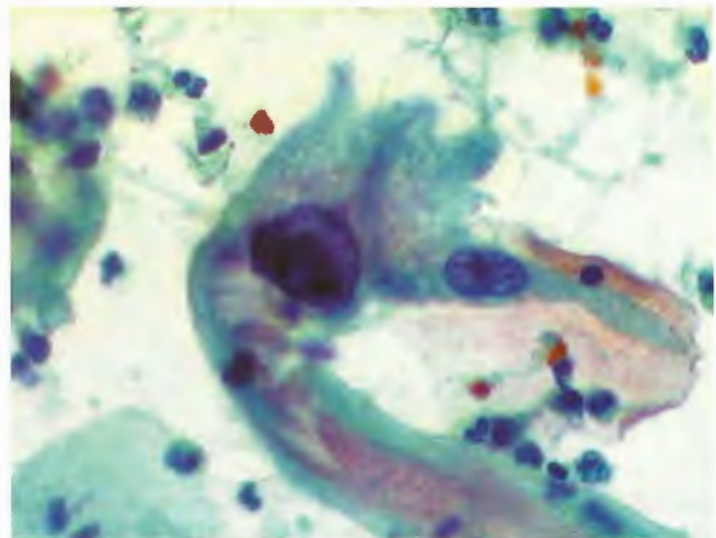
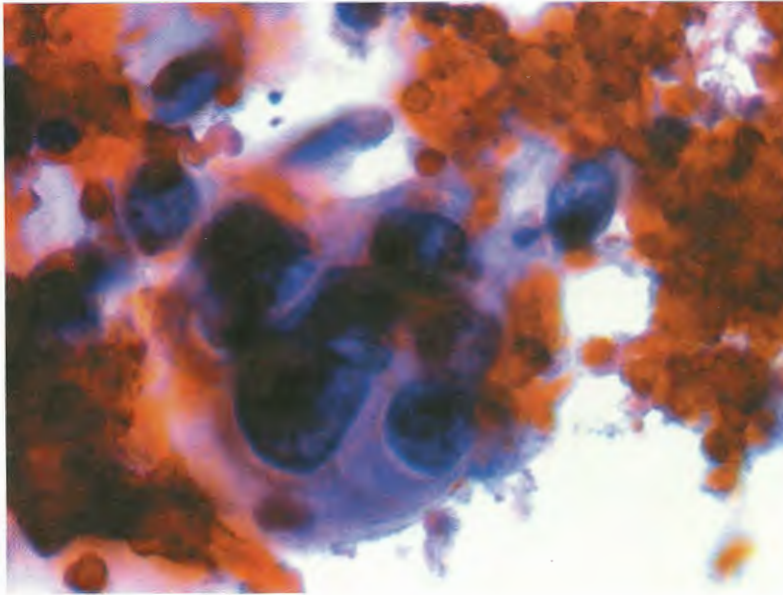



Figura 11.108 – Células pleomórficas carcinomatosas, hemácias e polimorfonucleares.

Carcinoma não queratinizante

As células aparecem isoladas ou em agregados com pleomorfismo menos evidente, exibindo núcleo grande/irregular e hipercromático, com marcante distribuição irregular de cromatina, macronucléolos e citoplasma cianofílico escasso e maldefinido. É frequente a presença de diátese tumoral (Figuras 11.109 a 11.114).

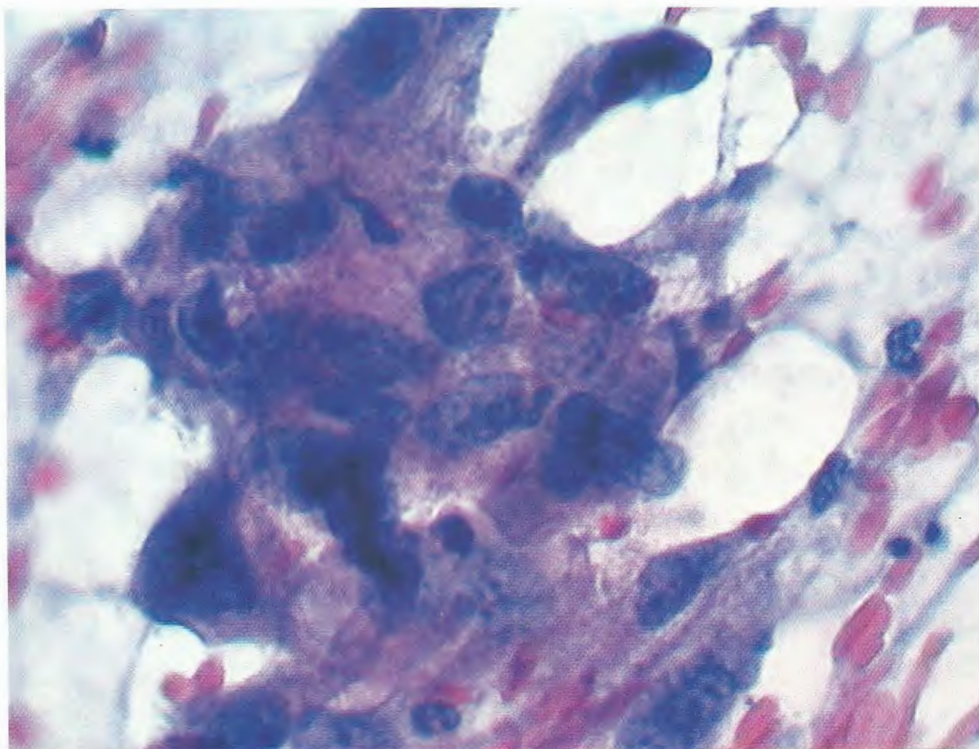



Figura 11.109 – Agrupamento de células com pleomorfismo exibindo núcleos grandes, irregulares e hipercromáticos, com distribuição irregular da cromatina e citoplasma escasso maldefinido.

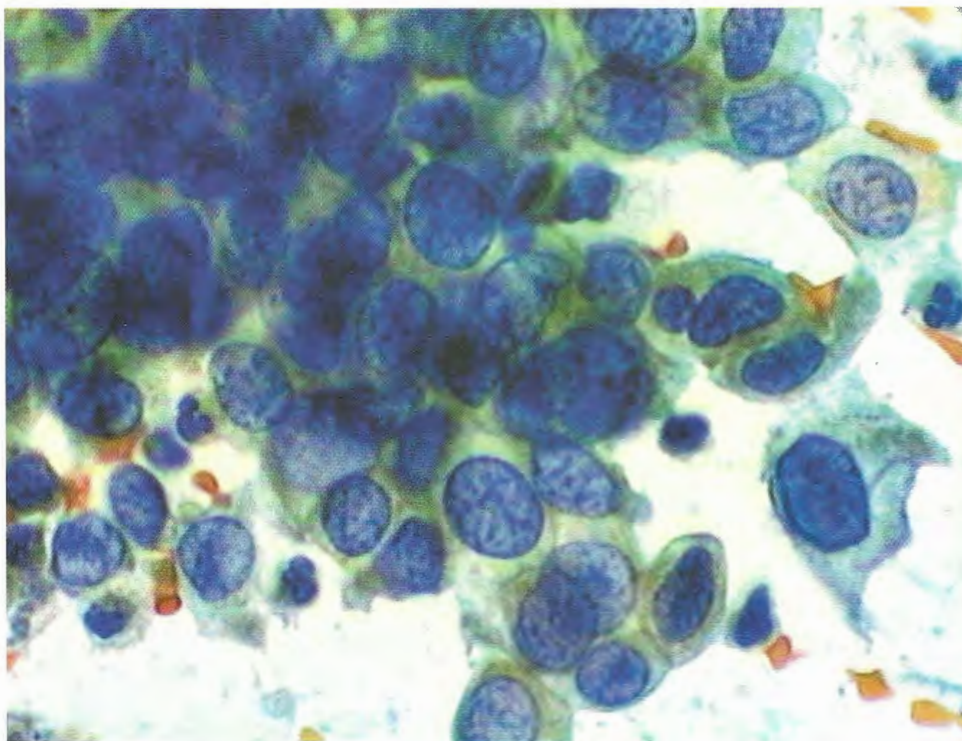



Figura 11.110 – Fundo hemorrágico exibindo agrupamento irregular de células com sobreposição de núcleos hipercromáticos.

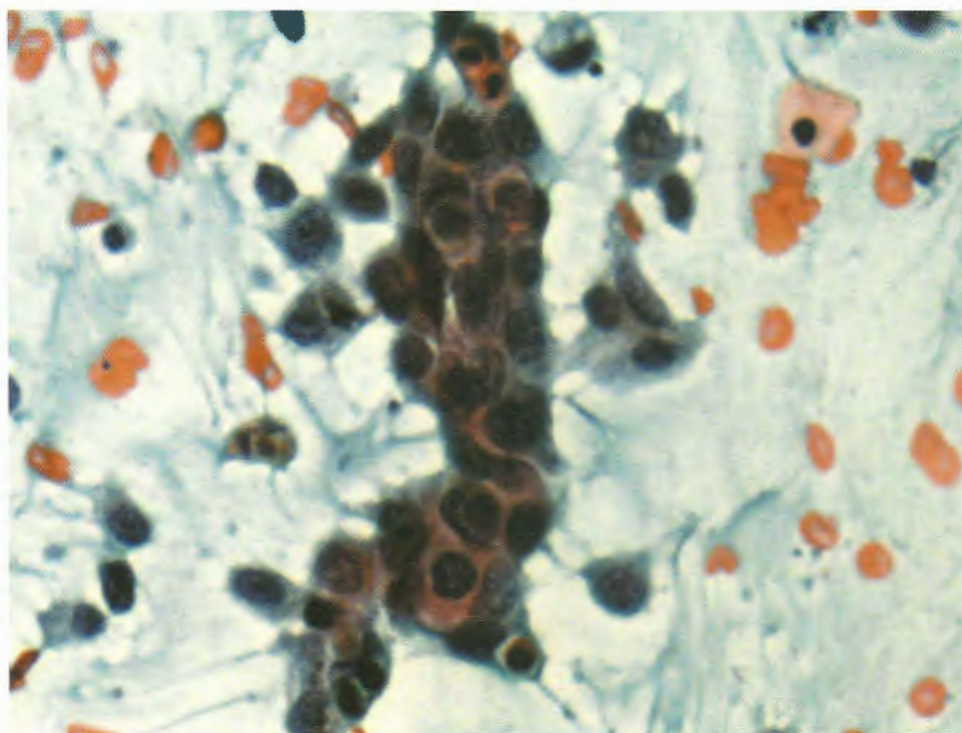



Figura 11.111 – Agrupamento apresentando células com núcleos grandes, irregulares e hipercromáticos, de distribuição irregular da cromatina, e citoplasma maldefinido.

978-85-4120-024-0

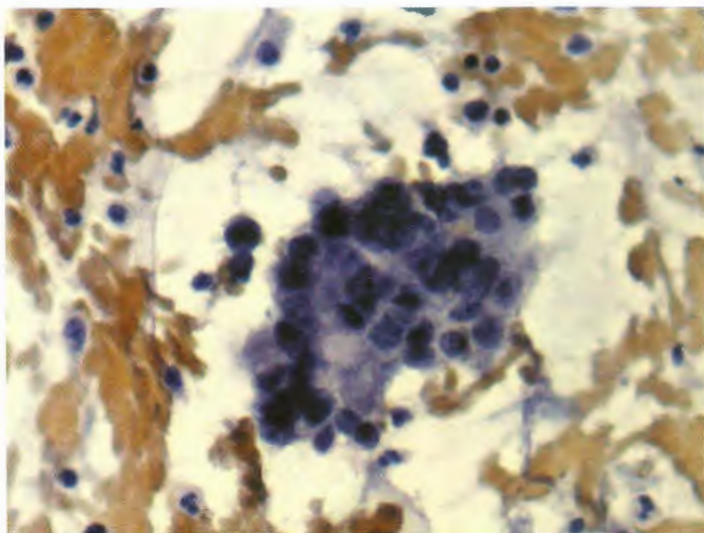



Figura 11.112 – Agrupamento irregular com núcleos hipercromáticos.

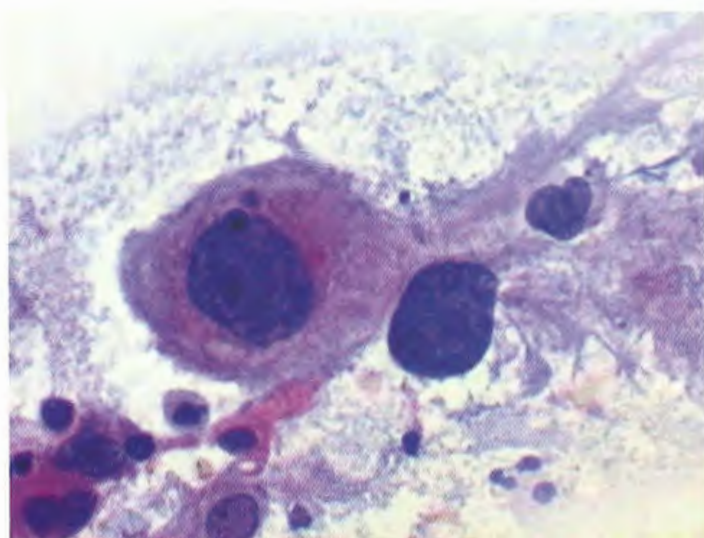



Figura 11.113 – Células grandes com macronucléolo e cromatina de distribuição irregular.

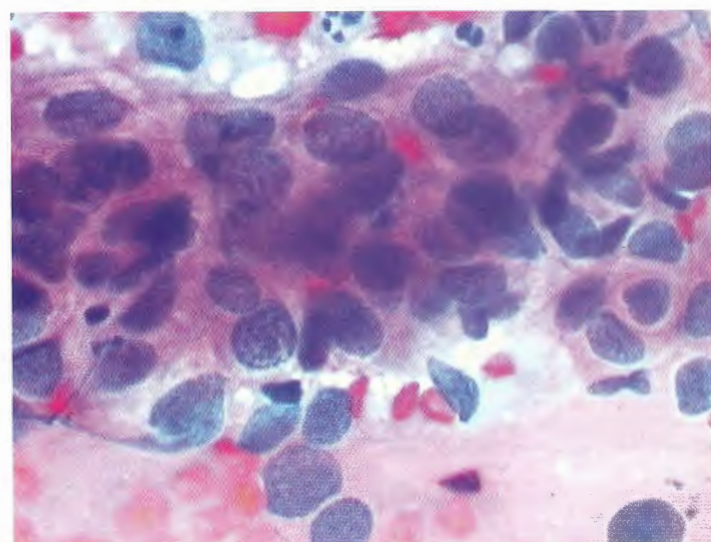



Figura 11.114 – Fundo hemorrágico exibindo agrupamento com alguma degeneração de células apresentando sobreposição de núcleos hipercromáticos e macronucléolos.

Carcinoma de pequenas células

As células são pequenas, com pleomorfismo discreto, e estão dispersas ou agrupadas, apresentando amoldamento nuclear (neuroendócrino). O citoplasma é escasso, maldefinido e cianofílico. O núcleo apresenta formato redondo ou ovoide, hipercrômico, com cromatina salpicada densa e nucléolo não perceptível (Figuras 11.115 a 11.120).

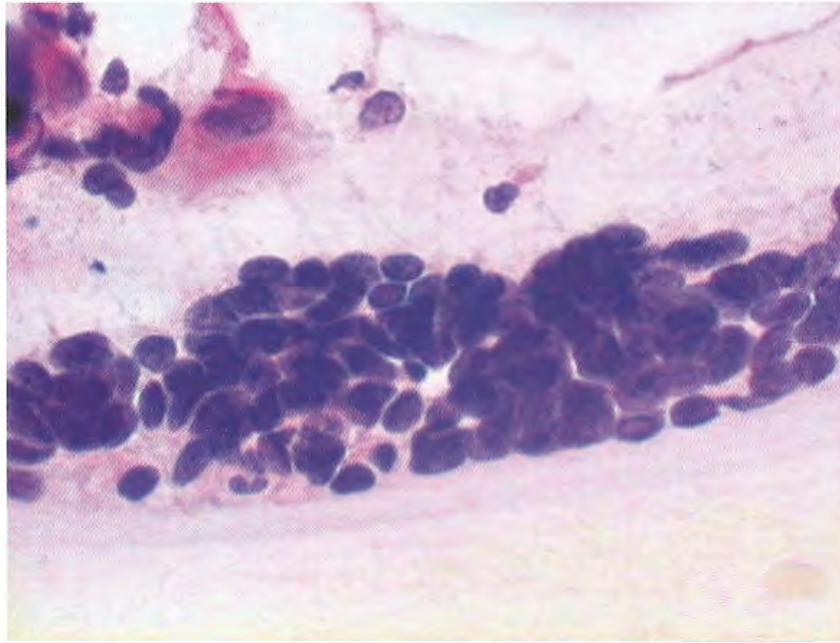



Figura 11.115 – Células pequenas agrupadas com discreto pleomorfismo, apresentando amoldamento nuclear e intenso hipercromatismo nuclear.

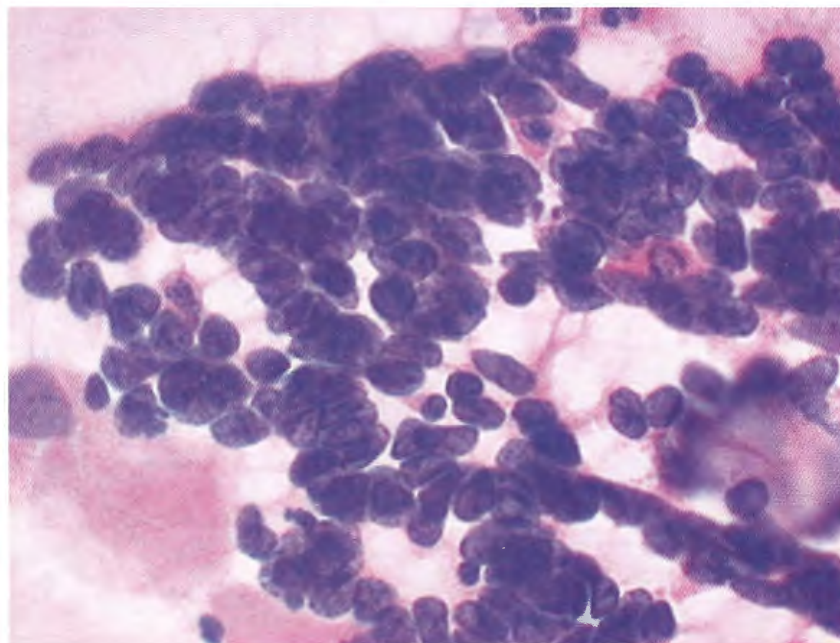



Figura 11.116 – Células com núcleos de formato redondo ou ovoide, hipercrômico e citoplasma escasso, maldefinido.

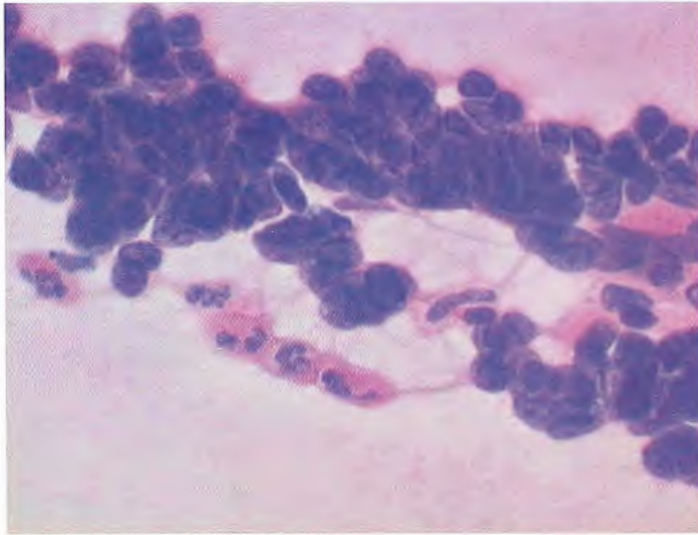



Figura 11.117 – Agrupamento denso de células pequenas apresentando amoldamento nuclear e intenso hipercromatismo nuclear.

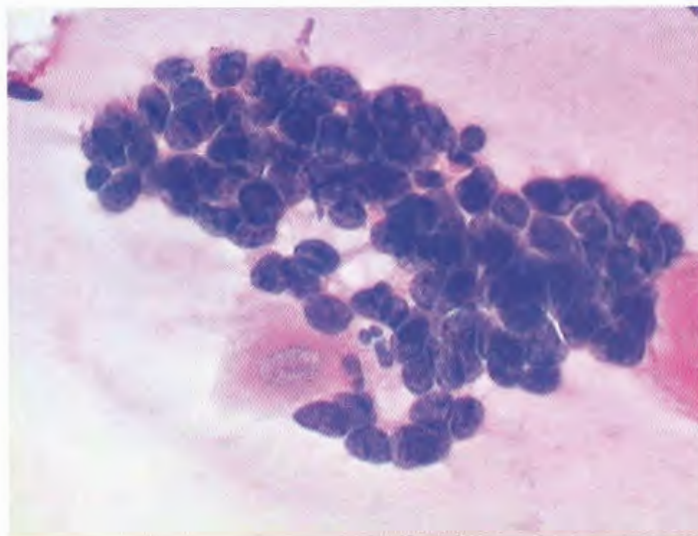



Figura 11.118 – Núcleos redondos ou ovoides, hipercrômicos, com cromatina salpicada densa e nucléolo não perceptível.

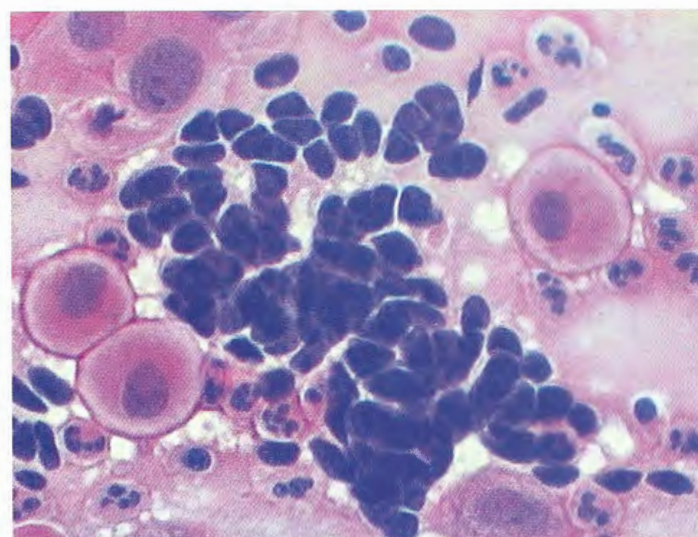



Figura 11.119 – Fundo hemorrágico com células pequenas agrupadas.

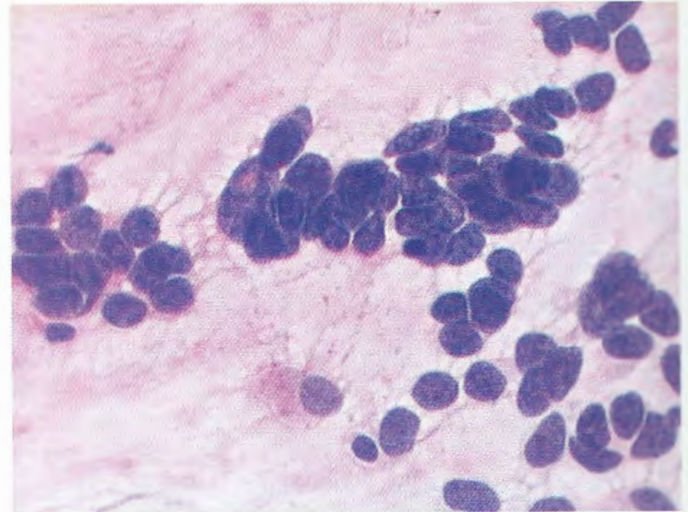



Figura 11.120 – Núcleos pequenos hipercromáticos com evidente amoldamento nuclear.

AGRADECIMENTO

Agradecemos, especialmente, a Erika Regina Matheus, Mestre em Farmácia, área de Análises Clínicas, pela revisão deste Capítulo.

Referências

1. STANLEY, M. **Gynecologic Oncology**. v. 117, 2010. p. S5-S10.
2. NAYAR, R.; SOLOMON, D. Second edition of 'the Bethesda system for reporting cervical cytology' – atlas, website, and Bethesda interobserver reproducibility project. **Cytojournal.**, v. 1, n. 1, p. 4, 2004.
3. GOMPEL, C.; KOSS, L. G. **Introdução à Citopatologia Ginecológica com Correlações Histológicas e Clínicas**. São Paulo: Roca, 2006.
4. DE MAY, R. M. Practical principles of cytopathology. **ASCP**, 2007.
5. BIBBO, M. **Comprehensive Cytopathology**. 2. ed., Philadelphia: W. B. Saunders, 1997.
6. SCHWARZ, E.; FREESE, U. K.; GISSMANN, L. et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. **Nature**, v. 314, n. 6006, p. 111-114, 1985.
7. BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. The viral etiology of cervical cancer. **Virus Res.**, v. 89, n. 2, p. 183-190, 2002. Review.
8. ZUR HAUSEN, H. The search for infectious causes of human cancers: where and why. **Virology**, v. 392, n. 1, p. 1-10, 2009.
9. JORDAN, L. B.; MONAGHAN, H. Pathology of the cervix: recent developments. **Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.**), v. 16, n. 4, p. 248-254, 2004. Review.
10. NARISAWA-SAITO, M.; KIYONO, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Sci.**, v. 98, n. 10, p. 1505-1511, 2007. Epub 2007 Jul 23. Review.
11. PARKIN, D. M.; BRAY, F. Chapter 2: the burden of HPV-related cancers. **Vaccine**, v. 24, Suppl. 3, p. S3/11-25, 2006. Review.
12. FRANCO, E.; VILLA, L.; ROHAN, T. et al. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. Ludwig-McGill Study Group. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 6, n. 4, p. 223-233, 1999.
13. SCHLECHT, N. F.; PLATT, R. W.; DUARTE-FRANCO, E. et al. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 95, n. 17, p. 1336-1343, 2003.
14. SHAH, K. V.; KESSIS, T. D.; SHAH, F. et al. Human papillomavirus investigation of patients with cervical intraepithelial neoplasia 3, some of whom progressed to invasive cancer. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 1996.
15. STOLER, M. H.; RHODES, C. R.; WHITBECK, A. et al. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. **Hum. Pathol.**, v. 23, n. 2, p. 117-128, 1992.
16. WENTZENSEN, N.; VINOKUROVA, S.; VON KNEBEL, D. M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. **Cancer Res.**, v. 64, n. 11, p. 3878-3884, 2004. Review.
17. ARIAS-PULIDO, H.; PEYTON, C. L.; JOSTE, N. E. et al. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 5, p. 1755-1762, 2006.
18. SMITH, J. S.; LINDSAY, L.; HOOTS, B. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. **Int. J. Cancer**, v. 121, n. 3, p. 621-632, 2007.
19. SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P. E.; JERONIMO, J. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890-907, 2007. Review.
20. BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 332-337, 2004. Review.
21. NUOVO, G. J.; MACCONNELL, P. B.; SIMSIR, A. et al. Correlation of the in situ detection of polymerase chain reaction-amplified metalloproteinase complementary DNAs and their inhibitors with prognosis in cervical carcinoma. **Cancer Res.**, v. 55, n. 2, p. 267-275, 1995.

22. NUOVO, G. J. In situ detection of PCR-amplified metalloproteinase cDNAs, their inhibitors and human papillomavirus transcripts in cervical carcinoma cell lines. **Int. J. Cancer**, v. 71, n. 6, p. 1056-1060, 1997.
23. IKENBERG, H.; TEUFEL, G.; SCHMITT, B. et al. Human papillomavirus DNA in distant metastases of cervical cancer. **Gynecol. Oncol.**, v. 48, n. 1, p. 56-60, 1993.
24. ITOH, Y.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases in cancer. **Essays Biochem.**, v. 38, p. 21-36, 2002. Review.
25. KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52-67, 2010. Review.
26. BRUMMER, O.; BÖHMER, G.; HOLLWITZ, B. et al. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation–an immunohistochemical study. **Gynecol. Oncol.**, v. 84, n. 2, p. 222-227, 2002.
27. SHEU, B. C.; LIEN, H. C.; HO, H. N. et al. Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. **Cancer Res.**, v. 63, n. 19, p. 6537-6542, 2003.
28. ZHOU, C. Y.; YAO, J. F.; CHEN, X. D. Expression of matrix metalloproteinase-2, 9 and their inhibitor-TIMP 1,2 in human squamous cell carcinoma of uterine cervix. **Ai Zheng**, v. 21, n. 7, p. 735-739, 2002.
29. GILLES, C.; POLETTE, M.; PIETTE, J. et al. High level of MT-MMP expression is associated with invasiveness of cervical cancer cells. **Int. J. Cancer**, v. 65, n. 2, p. 209-213, 1996.
30. DAVIDSON, B.; GOLDBERG, I.; GOTLIEB, W. H. et al. High levels of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP and TIMP-2 mRNA correlate with poor survival in ovarian carcinoma. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 17, n. 10, p. 799-808, 1999.
31. GAIOTTO, M. A.; FOCCHI, J.; RIBALTA, J. L. et al. Comparative study of MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) immune expression in normal uterine cervix, intraepithelial neoplasias, and squamous cells cervical carcinoma. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 190, n. 5, p. 1278-1282, 2004.
32. ZHAI, Y.; HOTARY, K. B.; NAN, B. et al. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion. **Cancer Res.**, v. 65, n. 15, p. 6543-6550, 2005.

Capítulo 12

Adenocarcinomas do Colo do Útero, Atipias Glandulares e Diagnósticos Diferenciais

Silvia Helena Rabelo dos Santos
Maria Cristina do Amaral Westin
Luiz Carlos Zeferino

INTRODUÇÃO

Os adenocarcinomas são o segundo tipo de neoplasia maligna mais comum do colo do útero. Carcinomas escamosos representam de 75 a 85% do total de casos, adenocarcinomas ocorrem entre 11% e 25% e carcinomas adenoescamosos, entre 2% e 3% dos casos[1,2], havendo aumento da incidência do adenocarcinoma. A história natural do adenocarcinoma do colo do útero tem padrão similar à do carcinoma de células escamosas, sobretudo em relação à existência de lesões precursoras e à associação com infecção por HPV de alto risco oncogênico[4,5].

Embora o AIS seja reconhecidamente o precursor de adenocarcinomas invasivos, lesões menos graves do que AIS não são bem caracterizadas epidemiológica e histologicamente[8-10]. Assim, tem-se dado mais atenção à presença e à avaliação das células endocervicais nos esfregaços citológicos, sobretudo após a implementação do sistema de Bethesda. Isso pode ser observado pela introdução de informações sobre a adequabilidade da amostra como parte integrante do laudo e pela criação da categoria diagnóstica de células glandulares atípicas, anteriormente denominada AGUS, e atualmente qualificada como AGC[4]. Este capítulo visa resumir os conhecimentos mais recentes relativos à epidemiologia, à história natural e ao diagnóstico dos adenocarcinomas do colo do útero, a suas lesões precursoras e aos possíveis diagnósticos diferenciais.

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

As tendências na incidência de adenocarcinoma do colo do útero variam com a idade e a localização geográfica. Há registros de aumento da incidência de 2 vezes nos EUA, 3 vezes na Noruega, 4 vezes no Canadá e de até 9 vezes na Inglaterra[5]. As razões associadas a esse fato não são completamente entendidas; provavelmente esse aumento é consequência de uma interação complexa entre mudanças ao longo do tempo em exposições que predispõem ao desenvolvimento de adenocarcinomas e alterações nas práticas de rastreamento do câncer do colo do útero, sobretudo a disseminação do uso da escova endocervical na coleta do esfregaço[6].

Razões etiológicas também devem ser consideradas, por exemplo, o aumento da prevalência de alguns fatores de risco potenciais para adenocarcinomas, como nuliparidade e obesidade. Da mesma forma, a utilização de contraceptivo oral, que atingiu seu pico entre mulheres com 20 e 30 anos, no início da década de 1960, nos países desenvolvidos, supostamente pode ter aumentado o risco de AIS. Associadamente, as formulações dos contraceptivos orais mudaram ao longo do tempo, e não se sabe como isso pode ter afetado as taxas de incidência. A tendência de as mulheres terem menos filhos em idades mais avançadas também está associada ao aumento do risco e, portanto, pode ter contribuído para o aumento simultâneo de adenocarcinomas invasores, particularmente nos estudos longitudinais mais recentes[6]. De fato, Castellsague *et al.*[3] mostraram que o uso a longo prazo da contracepção hormonal foi um dos cofatores associados ao adenocarcinoma do colo do útero entre mulheres em geral e nas HPV-positivas. A obesidade também pode contribuir para a etiologia hormonal[6].

O AIS é a única lesão precursora reconhecida do adenocarcinoma invasor. A incidência de AIS aumentou, principalmente, entre nulíparas ou primíparas em idade reprodutiva. A melhoria da amostragem celular e o aumento do reconhecimento de adenocarcinoma como entidade histológica podem justificar, em parte, o aumento da taxa de incidência de AIS[7]. Do ponto de vista epidemiológico, mulheres com diagnóstico histológico de AIS estão em faixa etária maior (média: 38,8 anos) quando comparadas a pacientes com NIC III, mais especificamente carcinoma *in situ* (média: 33,6 anos). Essa diferença não é observada para a forma invasora desses carcinomas, cuja média de idade, ao diagnóstico, está em torno de 51,7 anos para adenocarcinoma e 51,4 anos para carcinoma escamoso[8]. É possível que o AIS progrida mais rapidamente para adenocarcinoma invasivo, embora haja dados controversos. Há indicações de que a progressão do AIS para a forma invasiva ocorreria em um período de tempo que varia entre 5 e 13 anos, ao passo que o tempo de progressão da NIC para carcinoma escamoso variaria entre 10 e 18 anos[8]. Em relação ao prognóstico, alguns estudos mostram não haver diferença significativa nas taxas de sobrevida entre adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas[1,9]. Entretanto, um grande estudo envolvendo 1.700 pacientes tratadas por carcinoma escamoso, estágio 1B da FIGO, ou adenocarcinoma revelou que pacientes com adenocarcinoma têm pior prognóstico que aquelas com carcinoma de células escamosas no mesmo estágio e com o mesmo tamanho, por causa da maior frequência de metástases[10].

RELAÇÃO COM HPV: A IMPORTÂNCIA DE TIPOS E VARIANTES VIRAIS

Os tipos de HPV verificados em adenocarcinomas do colo do útero variam pouco em relação àqueles detectados em carcinomas escamosos. Há dois tipos predominantes em ambas as neoplasias: o HPV 16 e o 18, seguidos do tipo 45. A associação com os tipos 59, 35, 33, 31, 58 e 51 é bem menos frequente. Contudo, é importante observar que existe uma diferença na distribuição de tipos oncogênicos em carcinoma de células escamosas e adenocarcinomas cervicais. Estudos indicam que o HPV 16 é o mais prevalente em carcinomas escamosos, sendo observado em 50 a 60% dos casos, ao passo que o tipo 18 ocorre em 10 a 20% deles. Em contraste, o tipo 18 é observado em 40 a 60% dos

casos de adenocarcinomas, ao passo que o tipo 16 ocorre em 40 a 60% deles[21-24]. Vírus oncogênicos tipos 45 e 31 contribuem para os 7 a 9% restantes dos adenocarcinomas[6,11].

Castelsague *et al.*[3], em um estudo multicêntrico, demonstraram uma associação evidente dos tipos 16 e 18 com adenocarcinoma do colo do útero, com valores de OR, respectivamente, de 164,12 (95% IC: 76,09 a 354,0) e 410,32 (95% IC: 167,44 a ∞). Associações também foram observadas para os tipos 59 e 33 (OR > 100) e para os tipos 35, 45, 51 e 58 (OR > 18). Um estudo transversal retrospectivo mundial mostrou que o HPV dos tipos 16, 18 e 45 foram os três tipos mais comuns em cada grupo histológico (carcinomas escamosos, adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos). Esses tipos foram detectados em 6.223 dos 8.252 casos (75% IC 95% 75 a 76) de carcinomas escamosos e 443 dos 470 casos (94% IC 95% 92 a 96) de adenocarcinomas[11]. Rabelo-Santos *et al.*[12], em um estudo conduzido no Brasil, detectaram o HPV 16 em 66% dos adenocarcinomas do colo do útero, ao passo que o tipo 18 foi observado em 34% dos casos, contudo o tipo 18 mostrou a capacidade de predizer neoplasias glandulares. De Sanjose *et al.*[11] também mostraram que o HPV 18 e o 45 em conjunto foram significativamente mais comuns em casos de adenocarcinomas do que em casos de carcinomas escamosos.

É oportuno destacar a importância da diversidade intratípica, *i. e.*, diferenças genômicas com consequências biológicas, relacionada com os tipos virais 16 e 18[26]. Essas diferenças têm influência na persistência viral, ou seja, no tempo que o vírus consegue permanecer na cérvice uterina, na progressão das lesões por ele ocasionadas e também na associação ao padrão histopatológico das lesões. As chamadas variantes são caracterizadas por apresentarem uma similaridade nucleotídica de mais de 98%, em regiões específicas do genoma viral, em relação a um protótipo de mesmo tipo[13-15]. As variantes dos HPV 16 e 18 demonstram diferentes distribuições geográficas de prevalência. As variantes do HPV 16 são qualificadas como europeias, asiáticas, ásio-americanas e africanas, sendo as europeias consideradas protótipo. A diversidade intratípica do HPV 18 é semelhante à do tipo 16, sendo as variantes qualificadas como europeias, africanas e ásio-amerindianas[13,14]. Estudos mostram que infecções com as variantes do ramo não europeu do HPV 16 e do 18 têm tendência a serem mais persistentes e são mais associadas a lesões pré-invasivas[15]. Variantes ásio-americanas e europeias são mais prevalentes, respectivamente, em neoplasias glandulares e escamosas[16,17].

Berumen *et al.*[17] mostraram que as variantes ásio-americana e europeia do HPV 16 foram detectadas com frequência similar em carcinomas escamosos, mas somente a variante ásio-americana foi detectada em adenocarcinomas. Outros estudos também mostram que variantes não europeias foram observadas mais comumente entre adenocarcinomas do que entre carcinomas escamosos[13,16]. Burk *et al.*[13] observaram que as infecções por variantes não europeias de HPV 16 detectadas entre mulheres diagnosticadas com adenocarcinoma eram restritas primariamente a infecções com variantes da linhagem ásio-americana. Um estudo conduzido no Brasil[16] mostrou que, entre os 24 casos que apresentam HPV 16, a variante europeia foi detectada em 15 (62%) e a ásio-americana, em 9 (38%); entre os 15 casos associados à variante europeia, 14 (93%) apresentaram neoplasia escamosa e 1 (7%), adenocarcinoma invasor. A variante ásio-americana do HPV 16 foi significantemente associada ao diagnóstico histológico de neoplasia glandular. As variantes ásio-amerindianas do HPV 18 parecem estar associadas a adenocarcinomas e as variantes africanas, a carcinomas escamosos. Já as variantes europeias parecem apresentar uma distribuição intermediária, o que não é consensual[12]. De fato, o mesmo estudo conduzido no Brasil[16] mostrou que adenocarcinomas foram detectados em 4 dos 6 casos positivos para HPV 18, sendo 2 casos da variante europeia, 1 da variante ásio-amerindiana e 1 da variante africana.

Assim, considerando-se que o HPV é o agente etiológico do câncer cervical e o fato de as células de reserva com capacidade de diferenciação escamosa ou glandular serem os alvos principais

de infecção, uma hipótese seria de que o processo carcinogênico poderia tomar duas vias: uma para neoplasia escamosa e outra para neoplasia glandular. Se o HPV 18 estiver presente, a via preferencial seria a glandular. Quando é o HPV 16 que está presente, suas variantes devem ser consideradas. No caso de a variante ser ásio-americana, a via preferencial é a neoplasia glandular; no caso de a variante ser a europeia, a via preferencial é a escamosa[12]. Obviamente, os cofatores para cada neoplasia também devem ser considerados.

Evidências indicam que os cofatores que contribuem para a progressão do adenocarcinoma das células infectadas por tipos específicos de HPV são diferentes daqueles que contribuem para a progressão para carcinoma escamoso. Enquanto cofatores como alta paridade, infecções por *Chlamydia trachomatis e* tabagismo são associados ao aumento de risco para carcinomas escamosos, aos adenocarcinomas o são diferentes deles, como obesidade, soropositividade para HSV-2, fatores hormonais endógenos (como paridade) e fatores hormonais exógenos (uso de contraceptivos orais)[6]. Estudos indicam que o aumento na incidência de AIS em mulheres jovens e primíparas em idade reprodutiva está relacionado não só ao aumento em sua detecção, mas também ao aumento na incidência do HPV 18 e ao uso de contraceptivos orais[18].

DIAGNÓSTICO DOS ADENOCARCINOMAS CERVICAIS, LESÕES PRECURSORAS E DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS

O declínio da incidência do carcinoma escamoso é claramente atribuído ao rastreamento. O aumento na incidência dos adenocarcinomas, demonstrado em vários países entre 1973 e 1996, reflete o pouco benefício do rastreamento citológico realizado nas décadas de 1970 e 1980 na prevenção dessa neoplasia[1,2]. Entre as possíveis razões para a menor efetividade do rastreamento para adenocarcinomas, comparada à de carcinomas escamosos, estão a possibilidade de progressão mais rápida para a forma invasiva da doença e a menor sensibilidade do exame citológico para detecção de lesões precursoras de neoplasias glandulares, seja por erros de amostragem ou de interpretação[8,19].

Os erros de amostragem são consequência dos adenocarcinomas e por suas lesões precursoras derivarem-se do epitélio glandular e, frequentemente, estarem localizados dentro do canal do colo uterino, além da junção escamocolunar, sendo, por isso, menos acessível à escova, limitando assim a detecção precoce. Outro fator a considerar é que o fundo das glândulas costuma ser mais envolvido pelo processo neoplásico que a superfície epitelial, o que também pode comprometer as amostragens citológicas[19].

Os erros de interpretação referem-se ao fato de as lesões precursoras de adenocarcinomas serem consideravelmente menos frequentes e, consequentemente, menos definidas. Em média, de 0,2 a 0,5% dos esfregaços cervicais mostram alguma anormalidade relacionada com células glandulares, ao passo que 2% ou mais mostram anormalidades relacionadas com células escamosas. Consequentemente, a correlação entre os diagnósticos citológico e histológico para lesões glandulares é menor quando comparada à observada para as lesões escamosas. A obrigatoriedade da amostragem do canal endocervical e da zona de transformação, implementada na década de 1990, foi importante para a melhoria da qualidade do rastreamento de anormalidades glandulares do colo uterino. Resultados positivos em relação à melhoria no rastreamento já foram relatados por Mitchell *et al.*[20], que demonstraram que, a partir de 1994, houve diminuição no risco de adenocarcinoma do colo uterino associada ao resultado negativo de citologia cervical com representação endocervical. Esses autores também relataram que um esfregaço recente negativo foi mais frequente em pacientes do grupo-controle quando comparado a pacientes com AIS.

Tem-se dado mais atenção às anormalidades em células glandulares endocervicais desde 1988, quando da implantação do sistema de Bethesda,

que criou a categoria diagnóstica de células glandulares atípicas de significado indeterminado. Essa categoria era destinada às anormalidades em células glandulares endocervicais, além das observadas em condições reativas ou reparativas, mas ainda insuficientes para o diagnóstico de adenocarcinoma invasor. Na primeira revisão do sistema de Bethesda, em 1991, as atipias em células glandulares de significado indeterminado eram qualificadas como provavelmente reativas, sem outras especificações, ou provavelmente neoplásicas, este incluindo o diagnóstico de AIS[4]. No atlas do sistema de Bethesda publicado em 1994, o diagnóstico de atipias em células glandulares de significado indeterminado era indicado pela sigla AGUS[4].

O melhor conhecimento adquirido sobre o significado das células glandulares atípicas levou à introdução de mudanças nessa categoria, na segunda revisão do sistema de Bethesda, em 2001. Essas mudanças objetivaram aumentar a detecção de doenças em mulheres com diagnóstico de anormalidades em células glandulares. O diagnóstico anterior de AGUS foi modificado para o AGC com o objetivo de evitar a confusão com o de ASC-US, uma vez que o risco de lesão significante é muito maior em mulheres com AGC[41]. De fato, estudos demonstraram que 9 a 38% das mulheres com AGC têm lesão clinicamente importante (NIC II, NIC III, AIS e câncer) e 3 a 17%, carcinomas invasivos[4]. Sempre que possível, a origem das células glandulares atípicas deve ser indicada[4,21], uma vez que a abordagem clínica é completamente diferente. Células glandulares endometriais atípicas representam 5% de todos os casos de AGC, e um terço das mulheres com esse diagnóstico mostra lesões uterinas significantes, a maioria de origem endometrial, incluindo hiperplasia atípica e adenocarcinoma[4].

Considerando as anormalidades em células glandulares endocervicais, a eliminação do termo *provavelmente reativo* foi justificada pelo fato de que aproximadamente um terço dos casos qualificados dessa maneira mostrou lesões de alto grau, incluindo um número significativo de carcinomas invasivos nas avaliações de seguimento. A prevalência de neoplasias clinicamente significantes detectadas em mulheres com diagnóstico de AGUS provavelmente reativo mostrou-se semelhante à prevalência de lesões em mulheres encaminhadas por diagnóstico de AGC-SOE. Assim, na versão de 2001, a categoria AGC foi subclassificada em AGC AGC-SOE e AGC AGC-NEO. Essa separação foi justificada pelo fato de a prevalência de lesões graves ser significativamente maior após um diagnóstico de AGC-NEO (27 a 96%) quando comparada à observada depois de um diagnóstico de AGC-SOE (9 a 41%)[4,21]. Ainda como resultado do melhor conhecimento das anormalidades em células glandulares, introduziu-se o diagnóstico citológico de AIS, confirmado pela histopatologia em 48 a 69% dos casos; cerca de 40% dessas mulheres apresentam adenocarcinoma invasivo inicial ou bem-diferenciado. Esse fato é explicado pela semelhança de critérios citomorfológicos entre essas lesões[21].

Existem opiniões diferentes a respeito da utilidade da subclassificação da categoria AGC em AGC-SOE, AGC-NEO e AIS. Há indicações de que essa subclassificação mais detalhada pode ser um fator adicional na discrepância entre os resultados citológicos e histológicos. Mas há também contra-argumentos que mostram ser interessante a subclassificação do diagnóstico de anormalidades em células glandulares e que ela é coerente com as recomendações para a conduta clínica. Westin *et al.*[22] mostraram que essa subclassificação reflete diferentes taxas de associação com neoplasias escamosas ou glandulares. Assim, os diagnósticos citológicos de AGC-SOE, AGC-NEO e AIS representam aumento progressivo de risco para adenocarcinomas. É relevante diferenciar AGC-SOE de AGC-NEO, uma vez que o risco para neoplasia glandular é significantemente maior para mulheres encaminhadas por AGC-NEO. De fato, mulheres com AGC-SOE estavam acometidas por neoplasias escamosas em 21% dos casos e as com AGC-NEO, em 47% deles, sendo 20% de neoplasias escamosas e 27% de neoplasias glandulares. Mulheres com diagnóstico citológico de AIS tiveram diagnóstico histológico de adenocarcinoma em 79% dos casos.

AGC E AIS: DEFINIÇÕES E CRITÉRIOS PARA O RECONHECIMENTO

Conceitualmente, o diagnóstico de AGC-SOE refere-se a células do tipo endocervical, cujas alterações excedem as observadas em condições reativas ou reparativas, mas são insuficientes para o diagnóstico de AIS ou adenocarcinoma invasivo[4]. Os critérios para esse diagnóstico incluem:

- Células em lençóis ou tiras com discreto apinhamento e sobreposição.
- Aumento nuclear de 3 a 5 vezes a área de núcleos endocervicais normais.
- Variação no tamanho e na forma nucleares.
- Hipercromasia discreta.
- Nucléolos podem estar presentes.
- Figuras mitóticas podem ser vistas.
- O citoplasma pode ser abundante, mas há aumento da relação núcleo/citoplasma.
- As bordas celulares são frequentemente distintas.

O diagnóstico de AGC-NEO refere-se a células do tipo endocervical que apresentam alguns critérios, mas ainda considerados insuficientes para o diagnóstico de AIS ou adenocarcinoma invasivo. São critérios diagnósticos para AGC-NEO[4]:

- Células em lençóis ou tiras com apinhamento e sobreposição.
- Raros grupamentos podem mostrar rosetas ou plumagem.
- Núcleos aumentados com certo grau de hipercromasia.
- Mitoses ocasionais.
- Aumento da relação núcleo/citoplasma.
- Bordas citoplasmáticas pouco definidas.

AIS é definido como lesão glandular de alto grau, que é caracterizada por aumento nuclear, hipercromasia, estratificação e atividade mitótica, contudo sem invasão. Os critérios para esse diagnóstico, definidos pelo sistema de Bethesda, são[4]:

- Lençóis e aglomerados de células glandulares dispostas compactamente, com apinhamento e sobreposição nucleares, perda do padrão típico em "favo de mel"; células isoladas são incomuns.
- As características arquiteturais incluem tiras pseudoestratificadas de células epiteliais colunares, rosetas epiteliais e protrusão nuclear à periferia dos grupos (plumagem).
- Aumento nuclear com pleomorfismo.
- Aumento da relação núcleo/citoplasma.
- Hipercromasia, padrão de cromatina distinto, grosseiramente granular, mas uniformemente distribuída.
- Nucléolos pequenos e inconspícuos.
- Figuras mitóticas podem ser vistas.
- Fundo geralmente limpo, podendo estar presente um fundo inflamatório.
- Células escamosas anormais podem estar presentes.

Koss e Melamed[23] indicaram os seguintes critérios como importantes para o diagnóstico de AIS:

- Esfregaços com fundo geralmente livre de necrose e restos celulares; leucócitos e hemácias podem estar presentes.
- Anormalidades nucleares são menos marcadas do que nos adenocarcinomas invasores.
- Grupamentos esféricos de células malignas e fragmentos de glândulas endocervicais.
- Células em paliçada e rosetas são características mais comuns em AIS do que no invasivo. Plumagem pode ser observada em ambas as lesões.
- Ocasionalmente, podem estar presentes células ciliadas. Embora essas células ocorram, principalmente, em metaplasia tubária, sua presença não necessariamente indica lesão benigna se as características nucleares associadas sugerirem lesão maligna.

AIS do tipo endometrial ou intestinal mostra características diferentes. O tipo intestinal mostra sobreposição, apinhamento e células alongadas, acompanhadas de células caliciformes; o endometrial mostra células menores e semelhantes às células endometriais normais[4,23].

As Figuras 12.1 a 12.10 mostram casos caracterizados como AGS-SOE, AGC-NEO e AIS.

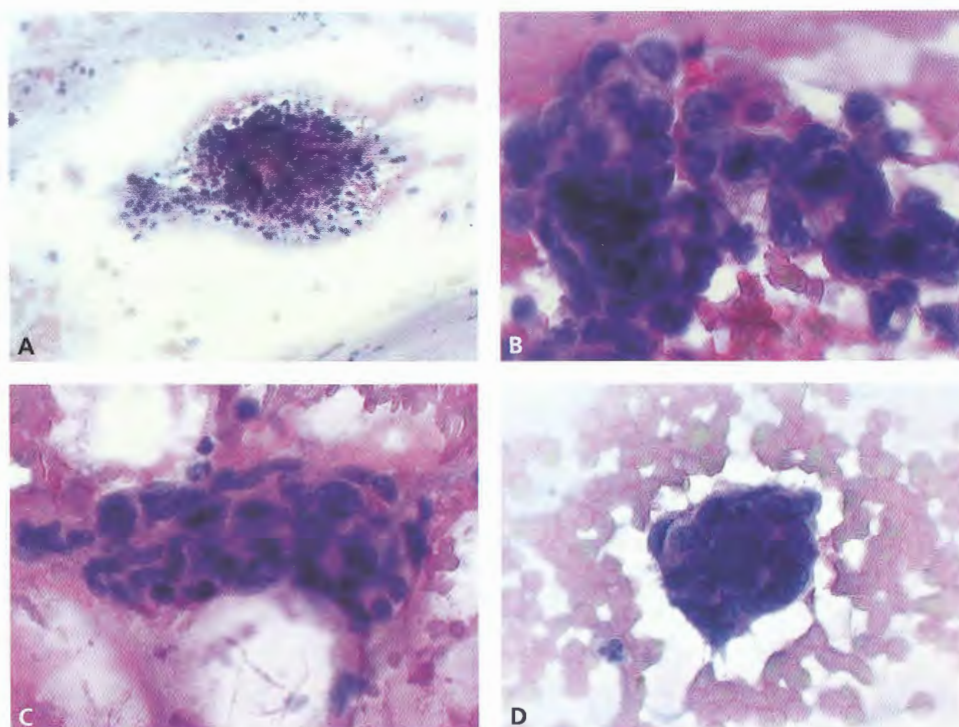



Figura 12.1 – (*A* – *D*) AGC-SOE no diagnóstico citológico. Grupamentos celulares com apinhamento e sobreposição. Há aumento nuclear de 3 a 5 vezes a área de núcleos endocervicais normais e hipercromasia. As bordas citoplasmáticas são visíveis, mas há aumento na relação núcleo/citoplasma. O diagnóstico histopatológico foi cervicite.

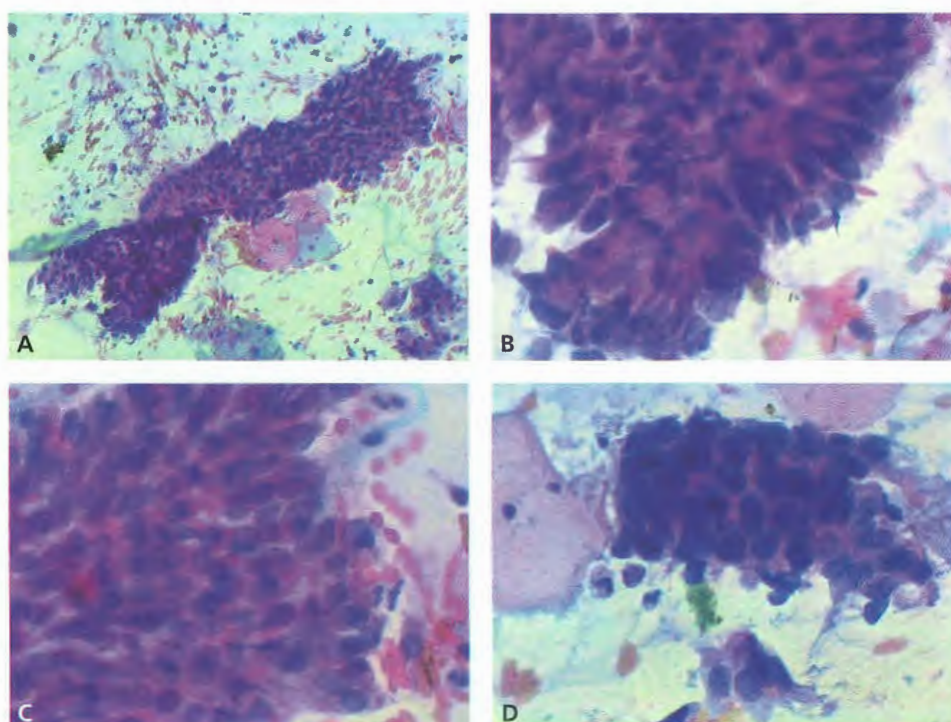



Figura 12.2 – (*A* – *D*) AGC-SOE no diagnóstico citológico. Grupamentos celulares mostrando apinhamento e sobreposição. Há aumento nuclear, hipercromasia, aumento na relação núcleo/citoplasma, contudo as bordas citoplasmáticas são visíveis. O diagnóstico histopatológico foi NIC III.

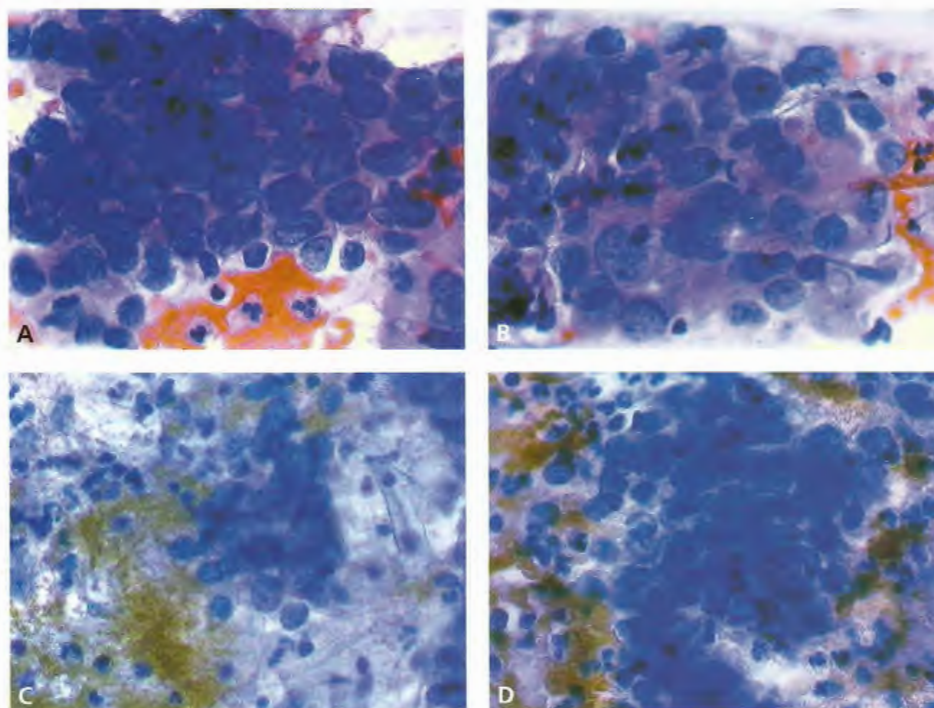



Figura 12.3 – (*A* – *D*) AGC-NEO no diagnóstico citológico. Grupamentos celulares mostrando maior apinhamento e sobreposição. Há aumento nuclear, anisocariose, hipercromasia e aumento na relação núcleo/citoplasma; as bordas citoplasmáticas são pouco visíveis em alguns grupamentos. O diagnóstico histopatológico foi cervicite.

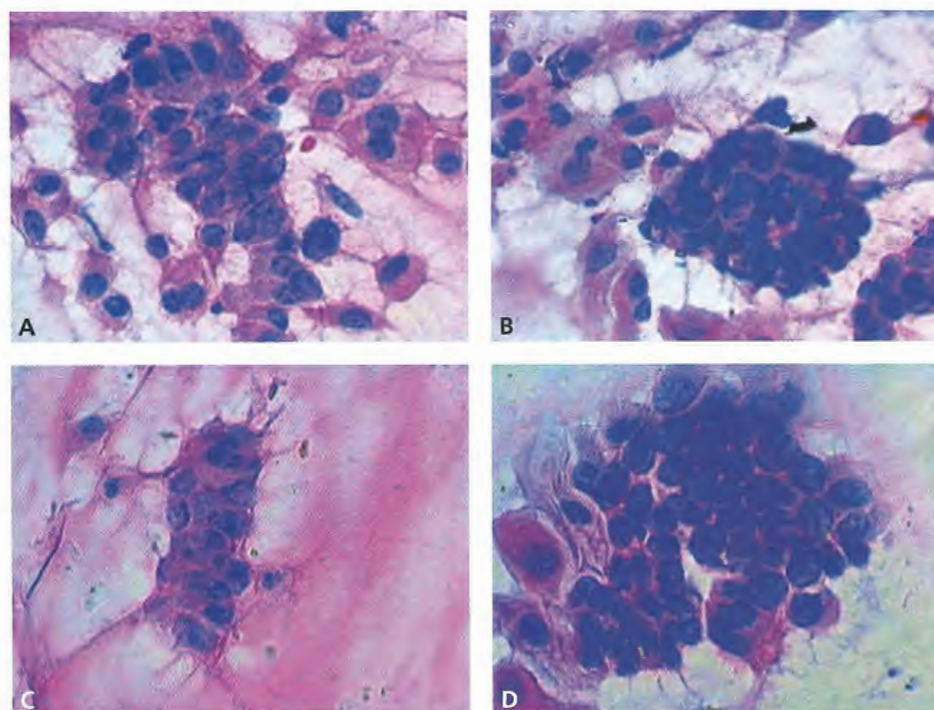



Figura 12.4 – (*A* – *D*) AGC-NEO no diagnóstico citológico. Grupamentos celulares com apinhamento e sobreposição; há aumento na relação núcleo/citoplasma e as bordas citoplasmáticas são pouco visíveis. Um dos grupamentos foi interpretado como em tira pseudoestratificada (*C*). O diagnóstico histopatológico foi NIC III. Grupamentos sugestivos de lesão intraepitelial escamosa de alto grau em glândulas também podem demonstrar células com disposição periférica em paliçada, pseudoestratificação e formações rudimentares em roseta.

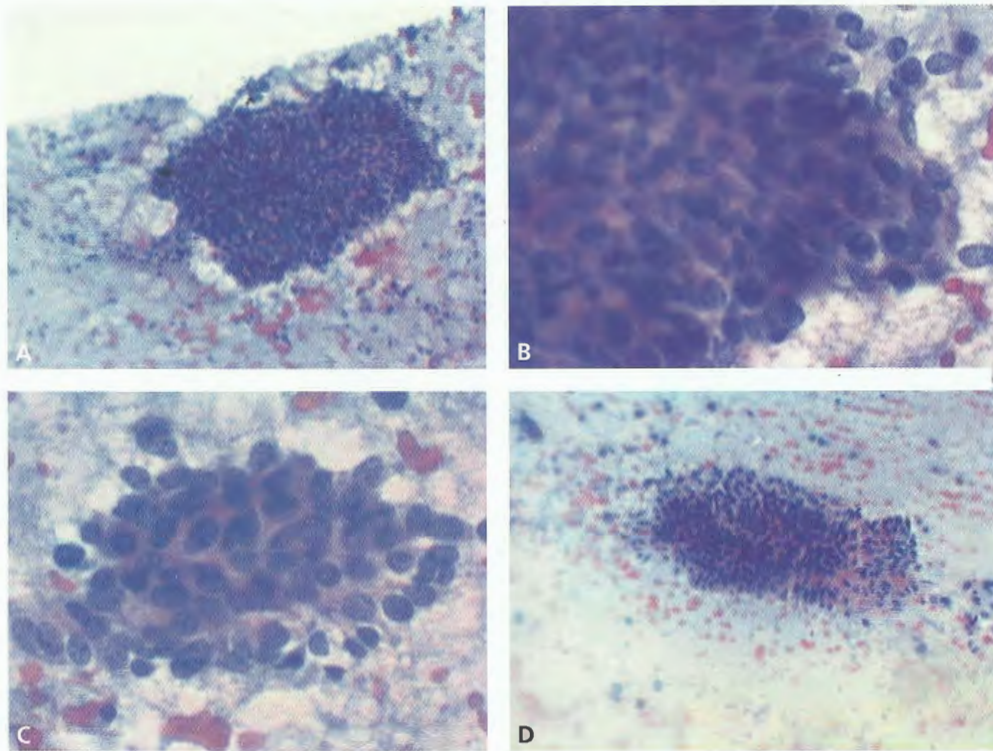



Figura 12.5 – (*A* – *D*) AGC-NEO no diagnóstico citológico. Grupamentos celulares com apinhamento e sobreposição, aumento na relação núcleo/citoplasma e bordas citoplasmáticas pouco visíveis. Hipercromasia evidente. O diagnóstico histopatológico foi NIC III.

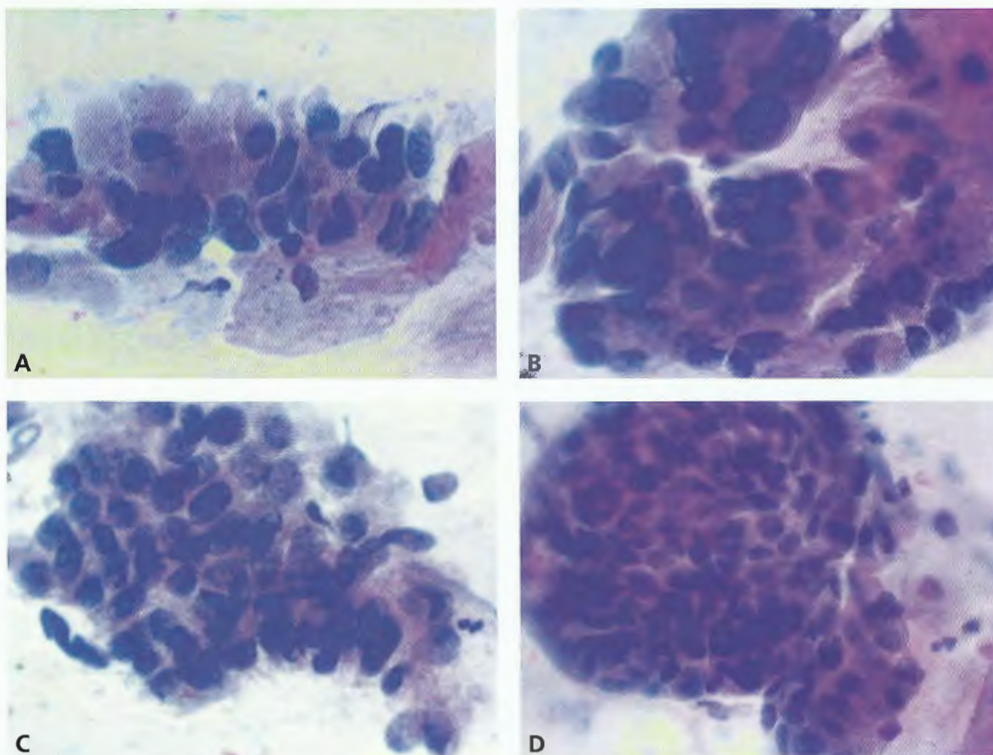



Figura 12.6 – (*A* – *D*) AGC-NEO no diagnóstico citológico. Grupamentos celulares com apinhamento e sobreposição, aumento na relação núcleo/citoplasma e bordas citoplasmáticas visíveis. O diagnóstico histopatológico foi de AIS.

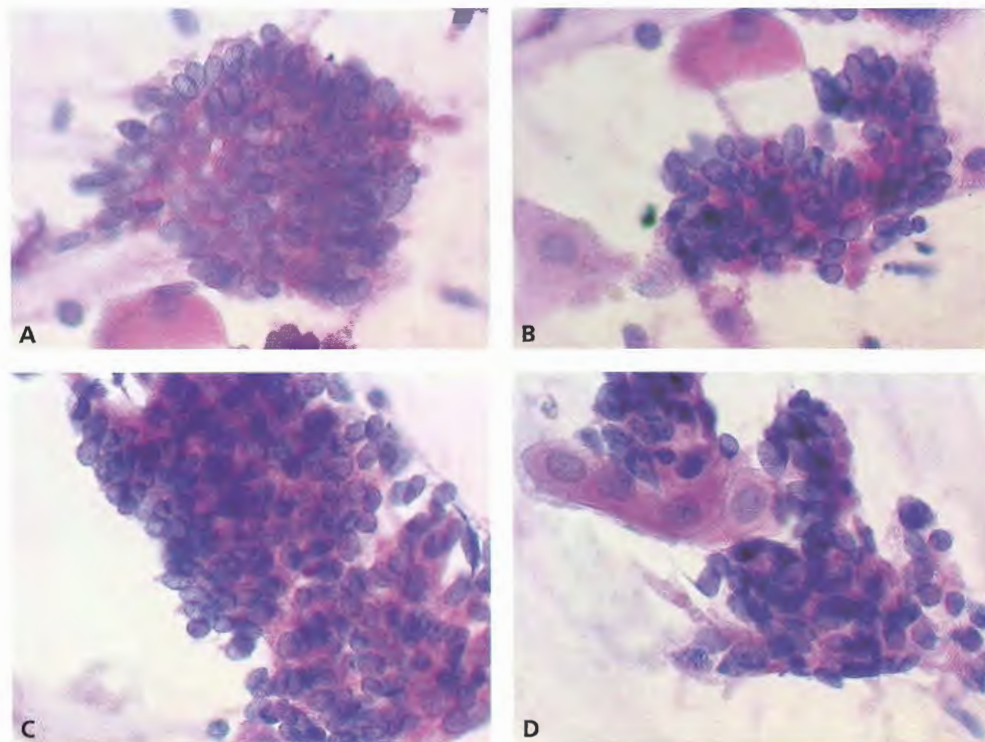



Figura 12.7 – (*A* – *D*) AIS no diagnóstico citológico. Grupamentos celulares com apinhamento e sobreposição, aumento na relação núcleo/citoplasma e hipercromasia. Nota-se formação em roseta na Figura *A*. O diagnóstico histopatológico foi de AIS.

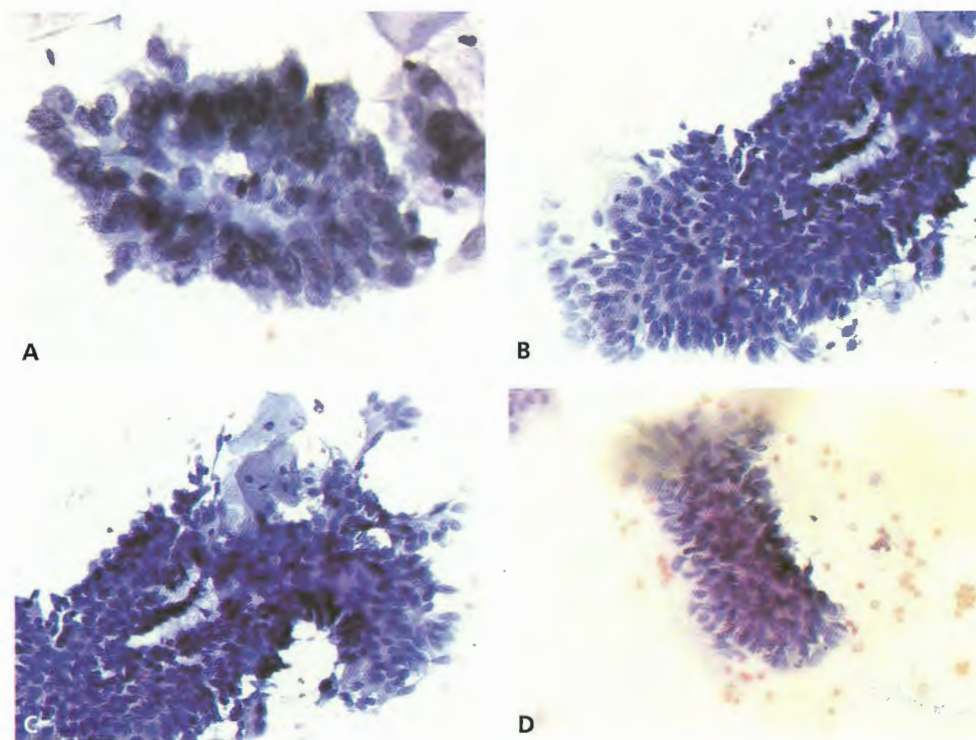



Figura 12.8 – (*A* – *D*) AIS no diagnóstico citológico. Grupamentos celulares com apinhamento e sobreposição, aumento na relação núcleo/citoplasma e hipercromasia. Notam-se aspecto de fundo de glândula com pesudoestratificacão na formação na Figura *A* e formações em plumagem nas demais (*B*, *C* e *D*). O diagnóstico histopatológico foi de AIS.

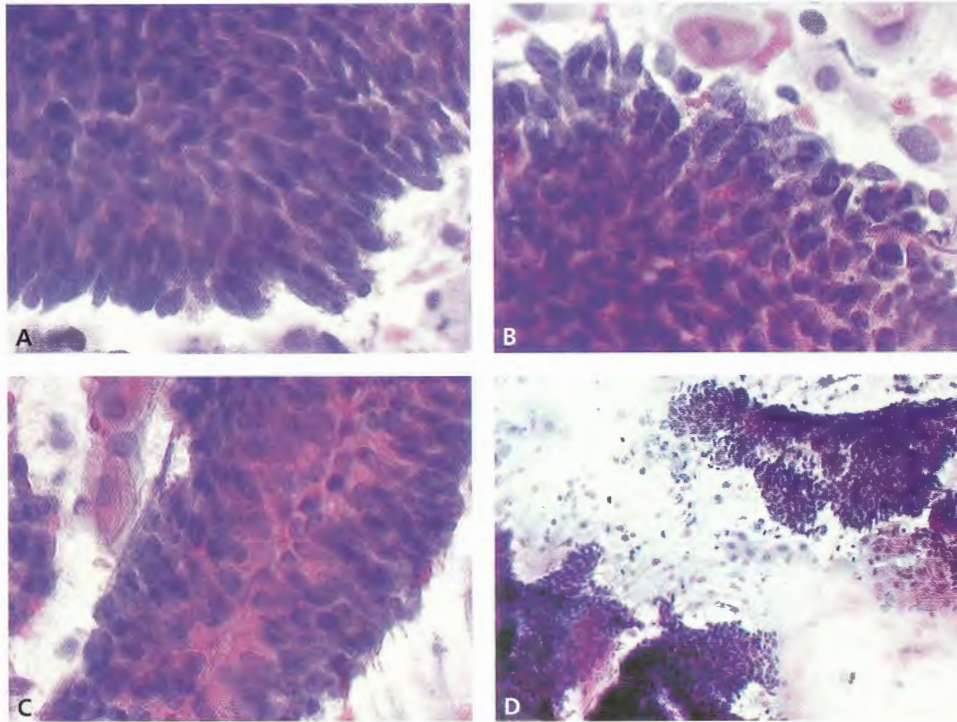



Figura 12.9 – Grupamento celular com apinhamento e sobreposição (*A*), tira pseudoestratificada (*B*), formações em papilares (*C* e *D*). O diagnóstico histopatológico foi adenocarcinoma bem-diferenciado.

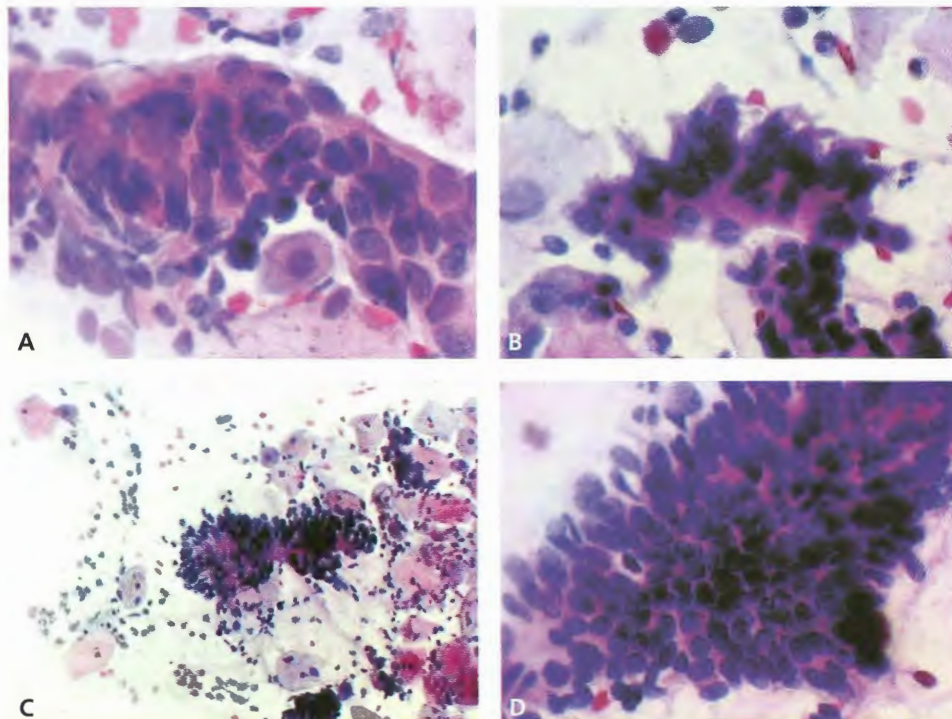



Figura 12.10 – (*A* – *D*) AIS no diagnóstico citológico. Grupamentos celulares com apinhamento e sobreposição, aumento na relação núcleo/citoplasma e hipercromasia. Nas Figuras *A* e *B*, notam-se pseudoestratificacão e, em *C* e *D*, aspecto de plumagem. O diagnóstico histopatológico foi de adenocarcinoma invasor bem-diferenciado com áreas de AIS.

ADENOCARCINOMAS INVASORES: DEFINIÇÕES E CRITÉRIOS PARA O RECONHECIMENTO

Histologicamente, os adenocarcinomas são classificados como[24]:

- *Mucinosos*: caracterizados por quantidade moderada de mucina citoplasmática. Incluem o tipo endocervical, bem e moderadamente diferenciado; o tipo intestinal, difuso ou focal; o tipo em "anel de sinete", focal e indiferenciado; o tipo viloglandular, relacionado com o uso de anticoncepcionais orais; e o tipo de desvio mínimo, que é uma variante altamente diferenciada de adenocarcinoma mucoso.
- *Endometrioides*: apresentam células mais numerosas, grupamentos menos amoldados e compactos e forma colunar.
- *De células claras*: tumor raro, histologicamente similar ao adenocarcinoma de células claras de ovário, endométrio e vagina. Embora seja reconhecida sua associação com exposição intrauterina ao dietilbestrol em mulheres jovens, seu pico de frequência ocorre em mulheres na pós-menopausa.
- *Serosos*: caracterizados por padrão complexo de papilas, com brotamentos celulares e frequentes corpos de psamoma. São histologicamente idênticos ao adenocarcinoma seroso de ovário.
- *Mesonéfricos*: derivam-se de remanescentes mesonéfricos e são frequentemente localizados em parede lateral e posterior da cérvice. Histologicamente, são comumente caracterizados por glândulas tubulares recobertas por epitélio cuboidal não mucinoso contendo secreção hialina eosinofílica.

Segundo Koss e Melamed[23], há ainda uma classificação que se baseia na frequência de aparecimento dessas neoplasias, uma vez que o seu prognóstico depende mais do estágio da doença do que de sua apresentação histopatológica. Entre os tipos mais comuns, incluem-se os adenocarcinomas produtores de muco, os adenocarcinomas endometrioides, os adenocarcinomas pouco diferenciados e os adenocarcinomas sincrônicos aos carcinomas escamosos. Os tipos menos comuns ou raros incluem os carcinomas adenoescamosos, os adenocarcinomas papilares tipo viloglandular, o carcinoma de células vítreas, o carcinoma mucoepidermoide, o carcinoma de células claras e os adenocarcinomas extremamente raros. Os adenocarcinomas são qualificados de acordo com a sua diferenciação, tomando-se por base a sua semelhança com o correspondente epitélio normal. Assim, são critérios importantes a serem avaliados: a relação núcleo/citoplasma, o grau de pleomorfismo nuclear, o padrão de distribuição da cromatina e a aparência e o número de nucléolos[19,23].

De acordo com Covell *et al.*[4], os adenocarcinomas bem-diferenciados podem mostrar critérios citológicos sobreponíveis aos diagnósticos de AIS, mas com características de invasão. Os critérios importantes para a suspeita de invasão incluem: células atípicas isoladas, macronucléolos, grupamentos papilares, clareamento nuclear com distribuição irregular da cromatina e diátese tumoral[4,23]. Em tumores bem-diferenciados, macronucléolos e diátese tumoral podem estar ausentes. São critérios importantes para o diagnóstico de adenocarcinoma invasivo[4]:

- Células anormais em grande quantidade, geralmente de configuração colunar.
- Células isoladas, grupamentos bi ou tridimensionais e agregados sinciciais são comuns.
- Núcleos grandes, pleomórficos, distribuição irregular da cromatina, clareamento da cromatina, membranas nucleares irregulares.
- Citoplasma, em geral fino e vacuolado.
- Diátese tumoral pode ser vista.
- Células escamosas anormais podem estar presentes, representando a coexistência de uma lesão escamosa ou um adenocarcinoma com diferenciação escamosa.

Como tipos comuns ou bem-diferenciados de adenocarcinomas, Koss e Melamed[23] indicam os adenocarcinomas mimetizando glândulas endocervicais, produtores de muco, e endometrioides. Citologicamente, os adenocarcinomas invasivos bem-diferenciados exibem as seguintes características:

- As células são, em geral, colunares, com núcleos de tamanho próximo ao das células endocervicais normais. O citoplasma é opaco, granular ou claro. As alterações nucleares incluem cariomegalia, hipercromasia, cromatina granular grosseira e nucléolos grandes, irregulares e múltiplos.
- As células costumam formar grupamentos sobrepostos esféricos ou ovais que podem corresponder a papilas tumorais. Na periferia desses grupamentos, pode-se observar a configuração colunar dos componentes celulares. Podem ser vistas formações glandulares dentro dos grupamentos.
- As células frequentemente se dispõem em tiras, com disposição paralela, umas ao lado das outras, formando imagem em paliçada, o que reflete o arranjo do tumor na superfície epitelial.
- As células também podem dispor-se ao redor de um lúmen central (rosetas), refletindo a tendência do tumor de formar glândulas.
- A plumagem das células na periferia dos grupamentos celulares costuma ser menos comum.
- Células aproximadamente esféricas, em "anel de sinete", são características de adenocarcinomas produtores de muco. Essas células mostram núcleos grandes e excêntricos, citoplasma com um único vacúolo grande ou vários vacúolos pequenos.
- Pode haver associação com células escamosas atípicas.
- A descamação de grandes grupamentos celulares resulta da fácil descamação a partir da superfície friável do tumor.
- Núcleos atípicos nus podem aparecer, principalmente, em espécimes colhidos por escova.

Koss e Melamed[23] indicam que adenocarcinomas invasivos pouco diferenciados costumam exibir[23]:

- Necrose, restos celulares e sangue.
- As células podem manter a configuração colunar. Contudo, com maior frequência, aparecem em grupamentos esféricos ou irregulares.
- As células mostram núcleos com grande variabilidade em tamanho e forma, com cromatina grosseira e grande nucléolo.
- Pode haver ausência de hipercromasia e o núcleo mostrar-se muito aumentado e pálido. Podem ser vistas figuras mitóticas. Em tais casos, em virtude da grande imaturidade celular, o diagnóstico de adenocarcinoma pode ser difícil.
- O número de células anormais presentes no esfregaço pode ser o primeiro alerta para a possibilidade de diagnóstico de adenocarcinoma.

Ainda considerando o grau de diferenciação dos adenocarcinomas de colo do útero, segundo DeMay[19], nos tumores de baixo grau ou mais bem diferenciados, as células são colunares e os núcleos, alongados, com cromatina grosseira e escura. Essas células costumam ser maiores do que as endocervicais normais com núcleos maiores, irregulares, exibindo também aumento da relação núcleo/citoplasma. O citoplasma é geralmente acidofílico, podendo estar presentes múltiplos vacúolos. Apinhamento nuclear e arranjos glandulares irregulares são importantes critérios diagnósticos. O apinhamento nuclear está particularmente presente em lesões *in situ* e nos adenocarcinomas invasivos bem-diferenciados. Comumente, também há sobreposição. Tiras de células são irregularmente estratificadas e mostram núcleos hipercromáticos.

Nos adenocarcinomas bem-diferenciados, os arranjos glandulares anormais incluem estruturas semelhantes a rosetas ou aberturas de glândulas secundárias nos grupamentos endocervicais. É importante considerar que não há glândulas

verdadeiras na endocérvice, e sim dobras de mucosa. Portanto, a presença de grupamentos endocervicais mostrando lumens glandulares bem-formados é equivalente ao padrão glândula em glândula, característico de adenocarcinomas em geral. Os grupamentos de células apinhadas podem mostrar bordas em plumagem; os tumores, grupamentos tridimensionais em bola e papilas.

Adenocarcinomas pouco diferenciados não mostram, com frequência, apinhamento nuclear. Com o aumento do grau do tumor, o núcleo pode tornar-se maior, aumentando também a relação núcleo/citoplasma. Os nucléolos podem tornar-se mais proeminentes e múltiplos, mas, em geral, permanecem redondos. Nos tumores de alto grau, a cromatina pode tornar-se pálida fina e irregularmente distribuída. Também, com o aumento do grau do tumor, as células tendem a perder a sua forma colunar e as bordas celulares tornam-se indistintas. O citoplasma torna-se mais granular e a vacuolização diminui.

Em relação aos adenocarcinomas endocervicais de tipo endometrioide, sua morfologia pode ser indistinguível da do adenocarcinoma de origem endometrial, entretanto os grupamentos celulares atípicos costumam ser mais numerosos. As características citológicas do carcinoma adenoescamoso são idênticas às observadas em caso

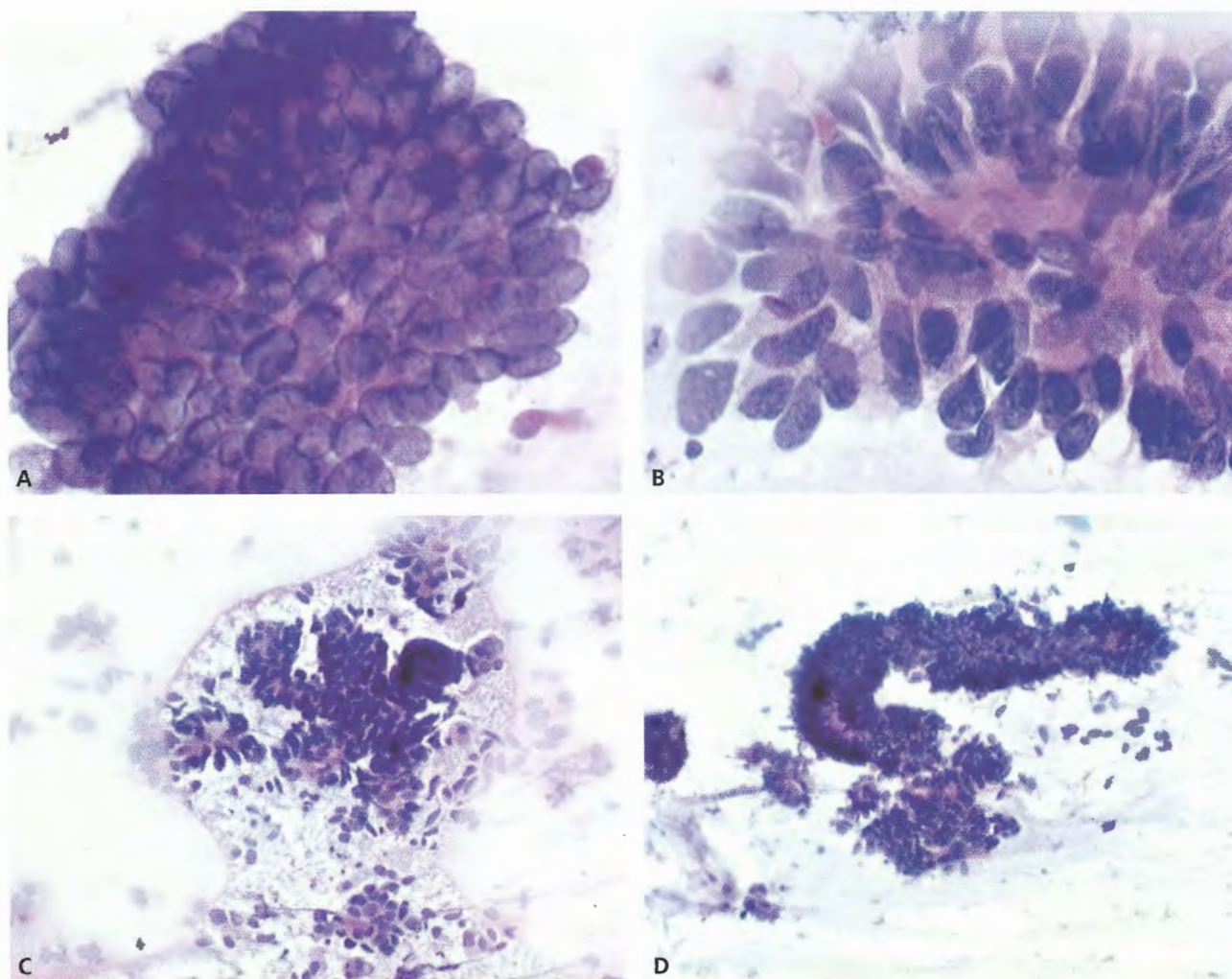



Figura 12.11 – (*A – D*) Adenocarcinoma invasor no diagnóstico citológico. Grupamentos celulares com apinhamento e sobreposição, aumento na relação núcleo/citoplasma e hipercromasia. Há protrusão dos núcleos à periferia dos grupamentos, aspecto em plumagem, contudo destacam-se as células isoladas e formações papilares. O diagnóstico histopatológico foi de adenocarcinoma invasor bem-diferenciado.

978-85-4120-024-0

de coexistência de adenocarcinomas e carcinomas escamosos[23]. Os elementos escamosos podem ser queratinizantes, não queratinizantes ou de pequenas células[19].

Os adenocarcinomas de células vítreas são variantes pouco diferenciadas de carcinomas adenoescamosos. Esses tumores podem mostrar citoplasma abundante e finamente granular e núcleo grande, com nucléolo proeminente[19]. Os adenocarcinomas viloglandulares mostram numerosos grupamentos de células endocervicais em multicamadas, fortemente coesivas, e perda do padrão em "favo de mel". Os grupamentos podem ser esféricos, com células achatadas à periferia, correspondendo às papilas do tumor, ou irregulares na forma, contendo células colunares[4,23]. Exceto por seu tamanho e configurações irregulares, esses grupamentos podem ser confundidos com grupamentos de células endocervicais normais. Os adenocarcinomas de células claras geralmente mostram citoplasma delicado, vacuolado, núcleos pálidos, irregulares e nucléolos evidentes. As células de adenocarcinomas de desvio mínimo lembram as células endocervicais benignas. Contudo, os núcleos costumam ser maiores, pálidos, com cromatina que varia de fina a granular, com a presença de macronucléolos em alguns casos[19,23].

As Figuras 12.11 a 12.23 mostram casos caracterizados como adenocarcinomas invasores.

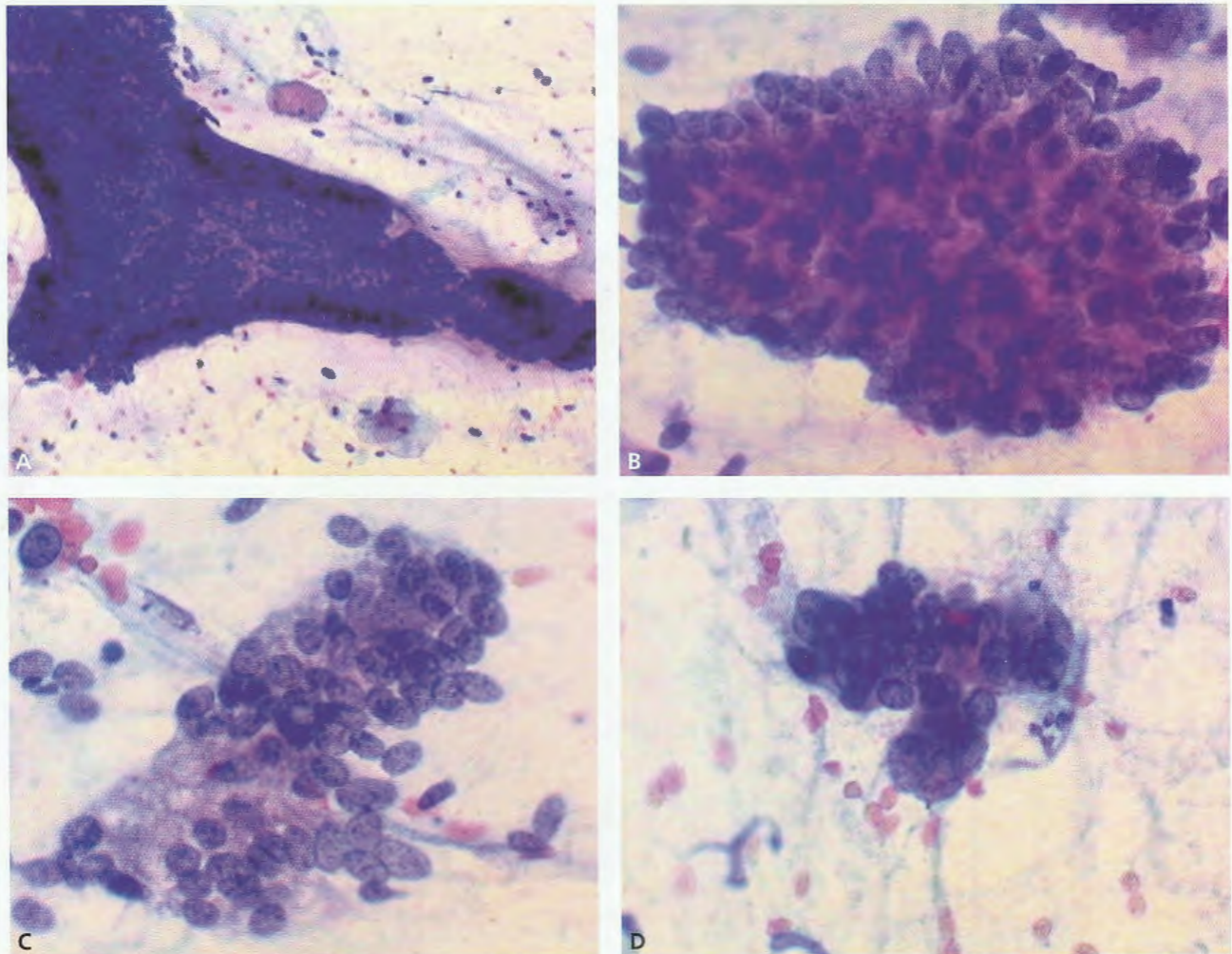



Figura 12.12 – (*A* – *D*) Adenocarcinoma invasor no diagnóstico citológico. Grupamentos celulares com apinhamento e sobreposição, aumento na relação núcleo/citoplasma e hipercromasia. (*A* e *B*) Há plumagem, tira pseudoestratificada (*C*) e formação papilar (*D*). O diagnóstico histopatológico foi de adenocarcinoma invasor bem-diferenciado.

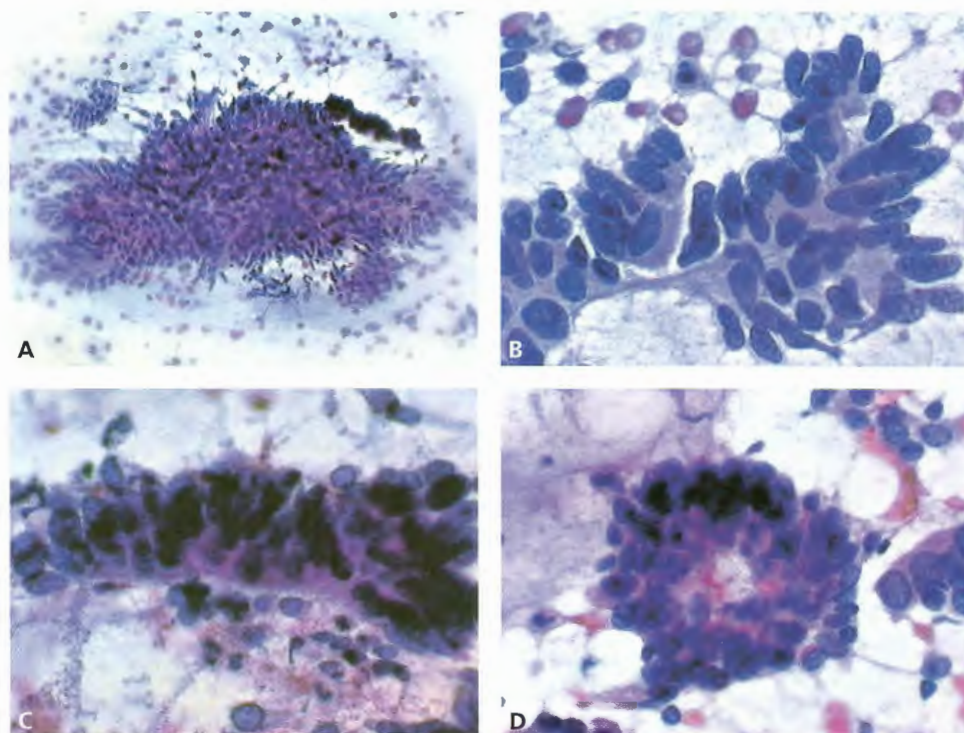



Figura 12.13 – (*A – D*) Adenocarcinoma invasor no diagnóstico citológico. Há plumagem, tira pseudoestratificada, roseta e diátese tumoral ao fundo.

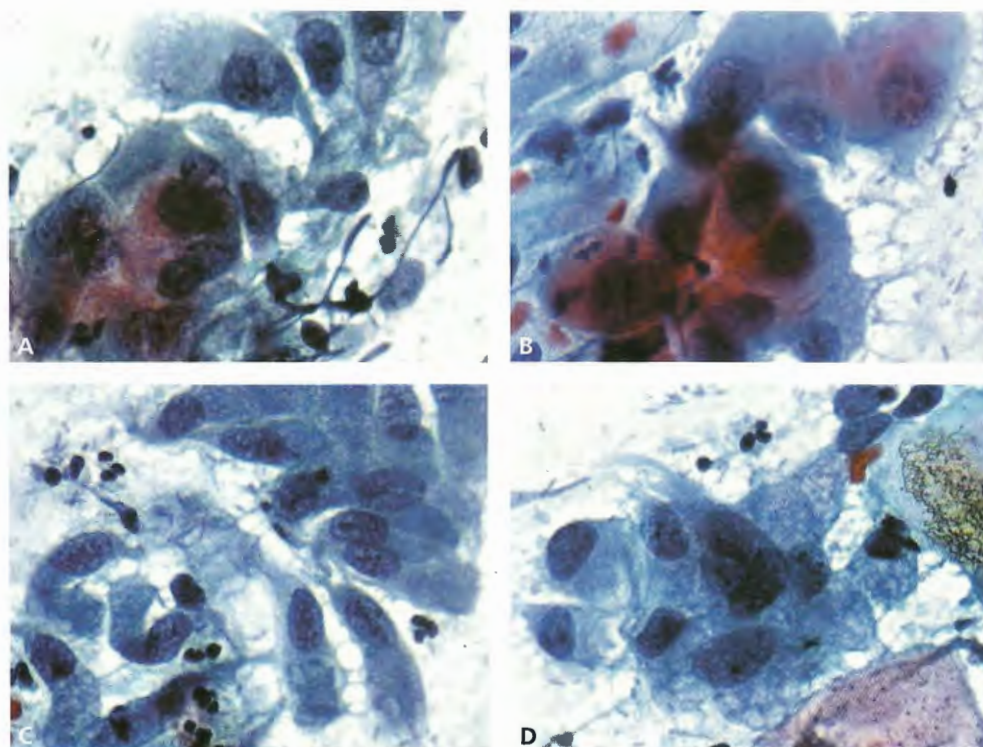



Figura 12.14 – (*A – D*) Adenocarcinoma invasor no diagnóstico citológico. Células anormais de configuração colunar. Núcleos grandes, pleomórficos, distribuição irregular da cromatina, clareamento da cromatina e membranas nucleares irregulares. Citoplasma fino e vacuolado.

978-85-4120-024-0

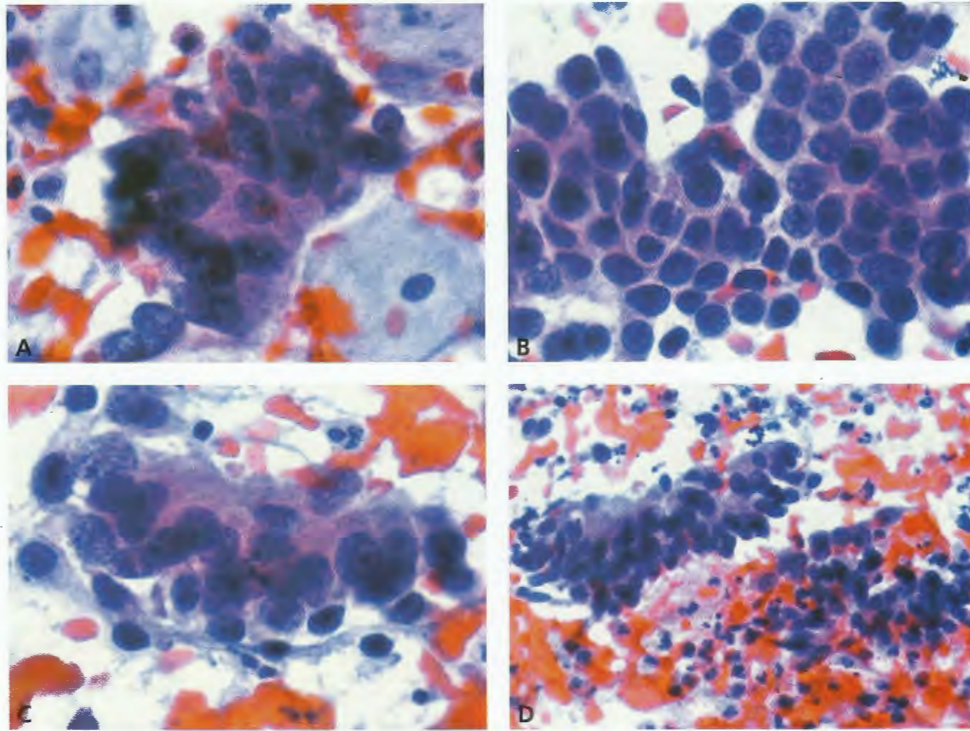



Figura 12.15 – (*A – D*) Adenocarcinoma invasor no diagnóstico citológico. Há tiras pseudoestratificadas, as células são colunares e os núcleos apresentam cromatina grosseira e escura. Essas células são maiores do que as endocervicais normais, com núcleos maiores, irregulares, exibindo também aumento da relação núcleo/citoplasma. Diátese tumoral ao fundo.

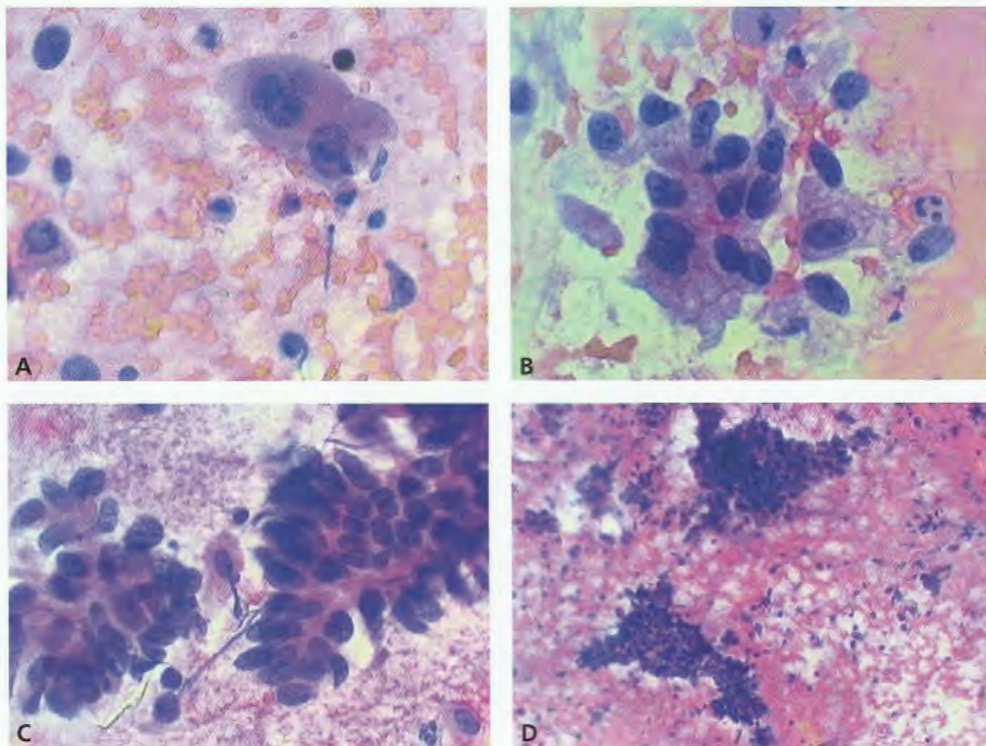



Figura 12.16 – (*A – D*) Adenocarcinoma invasor no diagnóstico citológico. Há plumagem, células atípicas isoladas mostrando clareamento da cromatina e nucléolos evidentes. Diátese tumoral ao fundo.

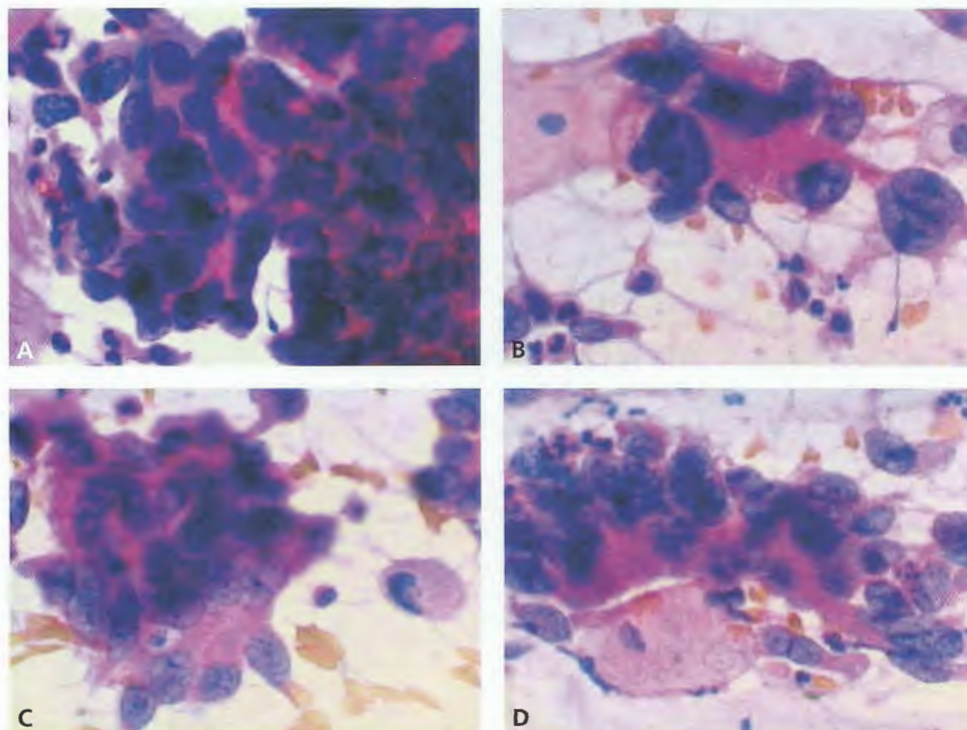



Figura 12.17 – (*A* – *D*) Adenocarcinoma invasor no diagnóstico citológico. Há tiras pseudoestratificadas, as células são colunares, maiores do que as endocervicais normais, os núcleos são hipercromáticos e apresentam cromatina grosseira. Há aumento da relação núcleo/citoplasma. Diátese tumoral ao fundo.

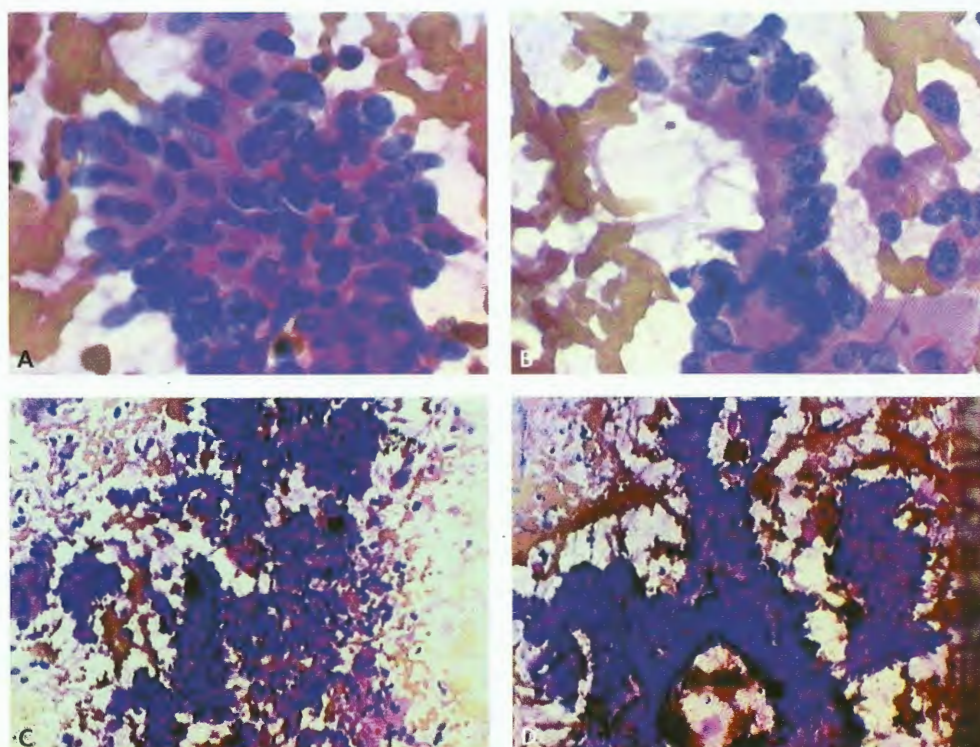



Figura 12.18 – (*A* – *D*) Adenocarcinoma invasor no diagnóstico citológico. As células formam grupamentos sobrepostos esféricos e formações papilares. As células dispõem-se em tiras, com disposição paralela, formando imagem em paliçada. Diátese tumoral ao fundo.

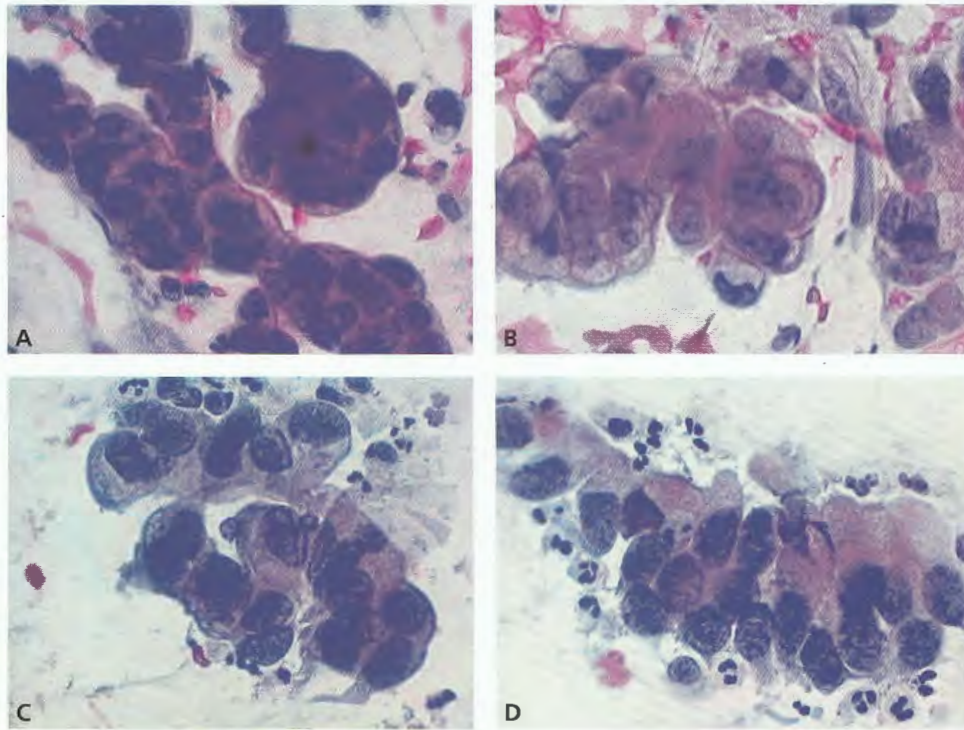



Figura 12.19 – (*A – D*) Adenocarcinoma invasor no diagnóstico citológico. As células formam grupamentos esféricos e papilares. O citoplasma é granular e claro. As alterações nucleares incluem cariomegalia, cromatina granular grosseira e grandes nucléolos.

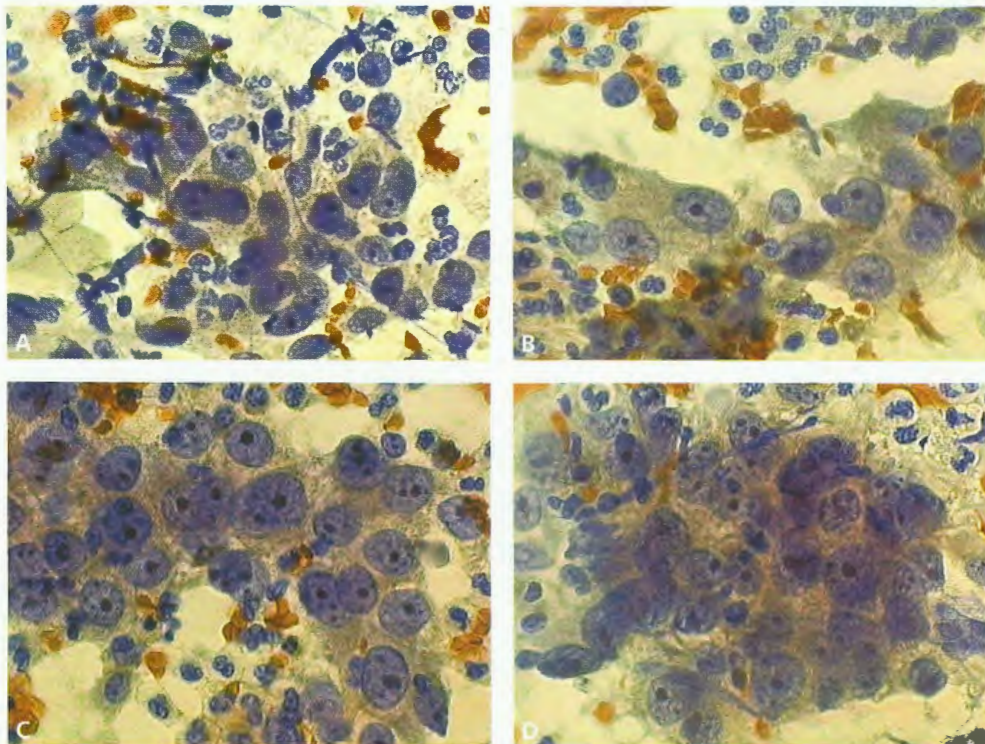



Figura 12.20 – (*A – D*) Adenocarcinoma invasor no diagnóstico citológico. O núcleo mostra aumento de tamanho, aumentando também a relação núcleo/citoplasma. Os nucléolos são proeminentes e múltiplos, a cromatina é pálida, fina e irregularmente distribuída. As células não apresentam forma colunar, e as bordas celulares tornam-se indistintas. O citoplasma é mais granular.

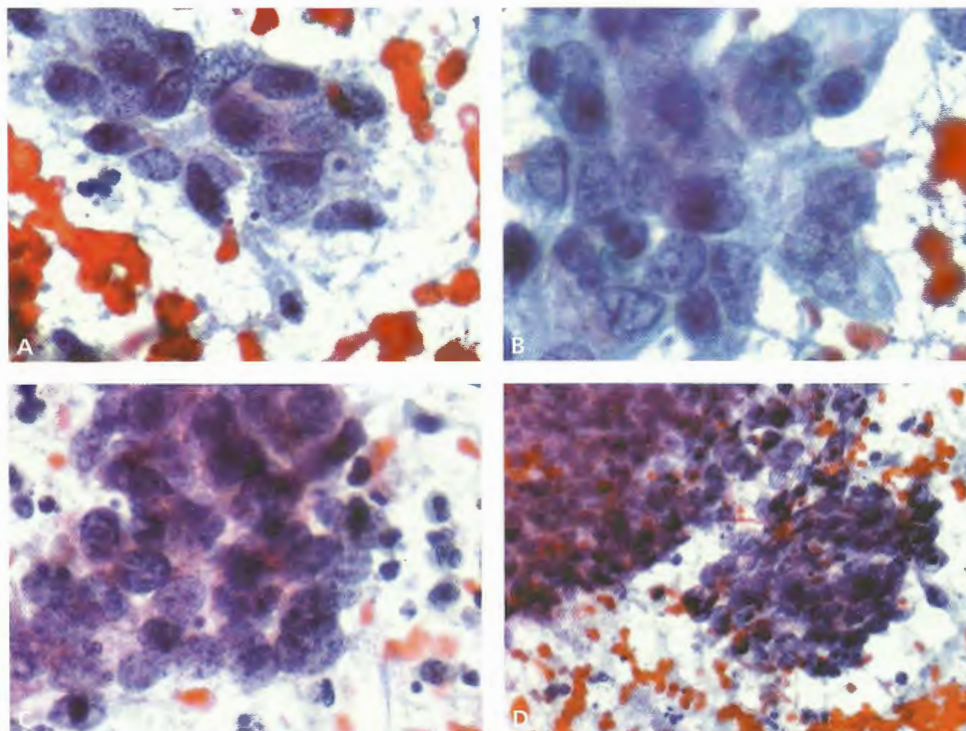



Figura 12.21 – (*A* – *D*) Adenocarcinoma invasor no diagnóstico citológico. As células mostram núcleos com grande variabilidade em tamanho e forma, com cromatina grosseira e grande nucléolo. Alguns núcleos mostram-se aumentados e pálidos. Necrose, restos celulares e sangue.

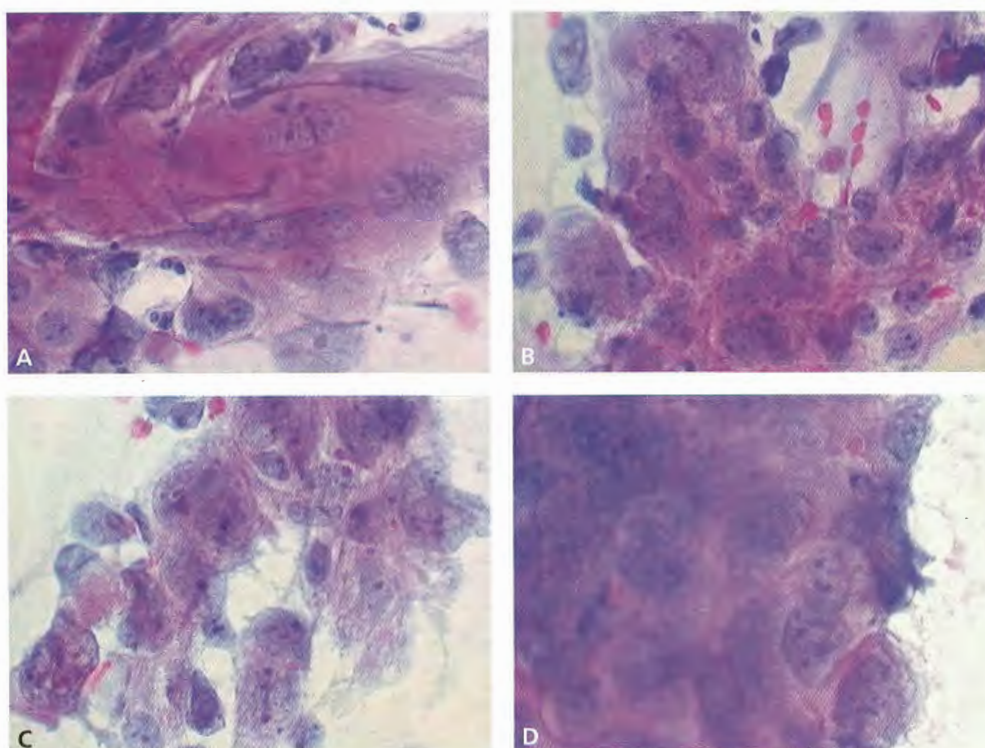



Figura 12.22 – (*A* – *D*) Adenocarcinoma invasor no diagnóstico citológico. As células mostram citoplasma abundante e finamente granular, núcleo grande com nucléolo proeminente.

978-85-4120-024-0

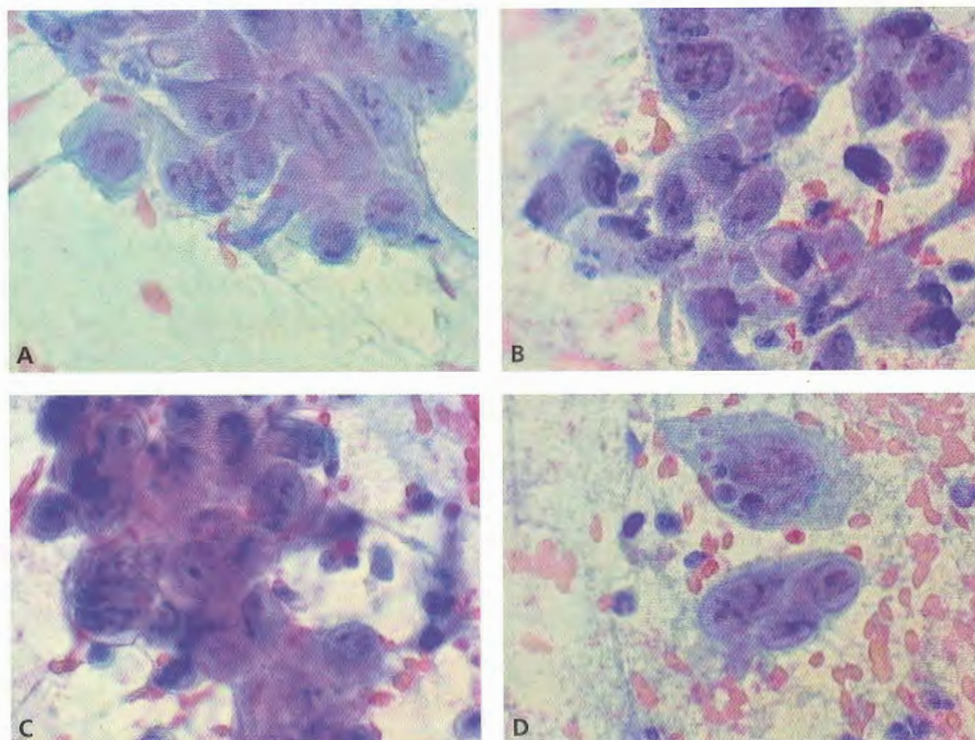



Figura 12.23 – (*A* – *D*) Adenocarcinoma invasor no diagnóstico citológico. As células mostram núcleos com grande variabilidade em tamanho e forma, com cromatina grosseira e grande nucléolo. Hipercromasia ausente, núcleo aumentado e pálido.

DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS

As células endocervicais podem mostrar uma variedade de alterações associadas a várias condições benignas que podem mimetizar anormalidades glandulares na citologia cervical. As alterações reativas das células endocervicais são caracterizadas pela manutenção do padrão em "favo de mel" ou em lençol, com citoplasma abundante, bordas citoplasmáticas bem-definidas e sobreposição nuclear mínima. Pode ocorrer certo pleomorfismo celular e aumento nuclear. Contudo, o núcleo permanece redondo ou oval, com contornos lisos e cromatina regularmente distribuída. Os nucléolos podem ser proeminentes e múltiplos, especialmente nos casos de reparo e inflamação. A mucina citoplasmática pode estar diminuída, dando ao grupamento celular aparência hipercromática. Esses casos devem ser considerados negativos para lesão pré-maligna ou maligna e não devem ser incluídos na categoria AGC[4].

As características gerais de AGC incluem aumento nuclear, apinhamento, variação no tamanho e hipercromasia. Alguns processos não neoplásicos podem mostrar essas características e apresentar dificuldades diagnósticas. Esses processos incluem, entre outros, células de segmento uterino inferior, metaplasia tubária, hiperplasia microglandular, pólipos endocervicais e efeitos de radiação ionizante[4,19]. Além disso, uma coleta mais vigorosa com o uso da escova endocervical pode resultar na representação de grandes grupamentos hipercromáticos de células endocervicais em uma condição denominada artefato de escova[4].

Células de segmento uterino inferior podem ser obtidas de amostragem da região ístmica do endométrio, por exemplo, por causa do encurtamento de canal endocervical após a realização de conização. Os grupamentos são grandes, hipercromáticos, tridimensionais, mas as células são menores que as endocervicais[23].

Hiperplasia microglandular é uma proliferação benigna de pequenas glândulas endocervicais e estroma. Alguns casos podem mostrar grupamentos sobrepostos, hipercromáticos, além

de aumento nuclear e presença de nucléolos. Células endocervicais isoladas e degeneradas, dispostas em faixas lineares, com núcleos picnóticos e citoplasma orangeofílico em decorrência da necrose de coagulação, sugerem diagnóstico não neoplásico. Essas células lembram células escamosas paraqueratóticas, sendo denominadas pseudoparaqueratóticas[19].

Metaplasia tubária é a substituição de células endocervicais por células de tuba uterina, fenômeno benigno. As células ocorrem, em geral, em pequenos grupos estratificados, frequentemente sobrepostos. Os núcleos são geralmente ovais, tendem a ser pleomórficos, frequentemente hipercromáticos, e o citoplasma pode mostrar vacúolos discretos ou formação caliciforme[4]. Placas terminais e cílios são fortes indicativos desse diagnóstico, ajudando a definir o processo como não atípico.

Numerosos estudos mostram que, muitas vezes, é difícil diferenciar AGC de metaplasia escamosa em esfregaços sugestivos de HSIL que envolvam a zona de transformação ou glândulas endocervicais[4,25,23]. Esses esfregaços mostram células atípicas com configuração colunar, citoplama delicado, núcleos com cromatina granular e nucléolos; essas células podem ser interpretadas como de origem glandular. Perda de polaridade, achatamento de células na perifeira dos grupamentos e presença de células escamosas disqueratóticas isoladas são características úteis para sugerir o diagnóstico de HSIL. Contudo, é importante destacar que grupamentos sugestivos de HSIL em glândulas também podem demonstrar células com disposição periférica em paliçada, pseudoestratificação e formações rudimentares em roseta[4,25,26].

Reações reparativas podem simular carcinomas ou adenocarcinomas cervicais. Reparo mostra, geralmente, lençóis de células coesas lembrando células metaplásicas. As células variam em tamanho, com citoplasma vacuolado e presença de fagocitose de polimorfonucleares. Os núcleos variam em tamanho e podem mostrar hipercroma-

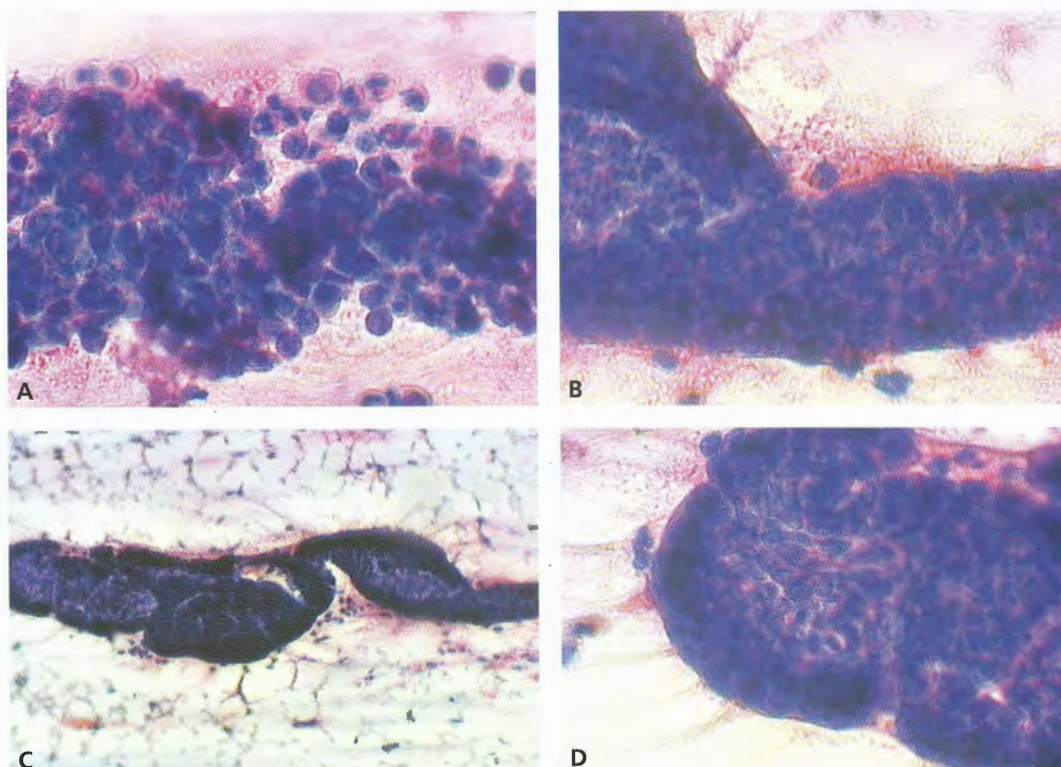



Figura 12.24 – (*A* – *D*) Células de segmento uterino inferior. Há sobreposição e apinhamento, grupamentos hipercromáticos, tridimensionais.

978-85-4120-024-0

sia e nucléolos de tamanhos variados[4,23]. Células isoladas, sobreposição, grupamentos arquiteturais anormais e diátese tumoral sugerem adenocarcinoma. A reação de Arias-Stella, processo benigno, costuma afetar células glandulares do endométrio, como também células de endocérvice e tubas uterinas. Em resposta a altos níveis de gonadotrofina coriônica humana e estimulação continuada pela progesterona, as atividades proliferativa e secretória ocorrem associadamente, e o resultado é o aparecimento de células pleomórficas com núcleos excêntricos, grandes e hipercromáticos e nucléolos proeminentes, ocasionalmente múltiplos. Essas células podem assemelhar-se às células de adenocarcinomas, principalmente do tipo células claras. Sinais de malignidade podem ajudar a definir o diagnóstico como adenocarcinoma.

Neoplasias escamosas, incluindo as lesões de alto grau, particularmente as que envolvem glândulas endocervicais, ou carcinomas invasores não queratinizantes podem simular adenocarcinomas. A ausência de nucléolos mais evidentes e arranjos glandulares anormais, como plumagem, tiras, rosetas e papilas, pode auxiliar no diagnóstico diferencial. Outro diagnóstico diferencial importante a ser observado são os casos de adenocarcinoma endometrial. Adenocarcinomas endometriais mostram, em geral, células menores e de configuração esférica. Os nucléolos costumam ser menos evidentes, a cromatina, mais grosseira, sendo comuns hipercromatismo e vacuolizações citoplasmáticas, além de maior frequência de células degeneradas. Adenocarcinomas metastáticos de colo podem mimetizar adenocarcinoma endocervical, exibindo células glandulares grandes, produtoras de muco. A história clínica, nessas situações, é essencial.

As Figuras 12.24 a 12.32 mostram os diagnósticos diferenciais de AGC, AIS e adenocarcinomas.

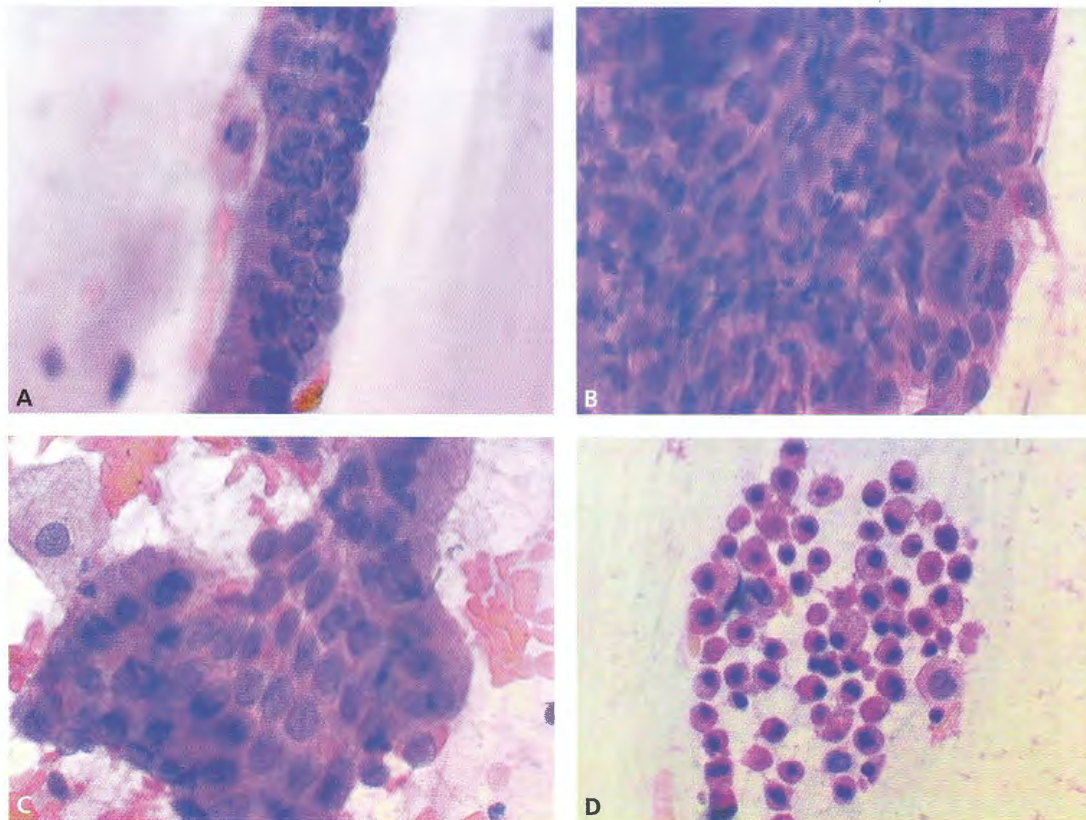



Figura 12.25 – (*A – D*) Hiperplasia microglandular: presença de grupamentos sobrepostos, hipercromáticos, aumento nuclear e presença de nucléolos. Presença de células endocervicais isoladas e degeneradas dispostas em faixas lineares, com núcleos picnóticos e citoplasma orangeofílico (células pseudoparaqueratóticas).

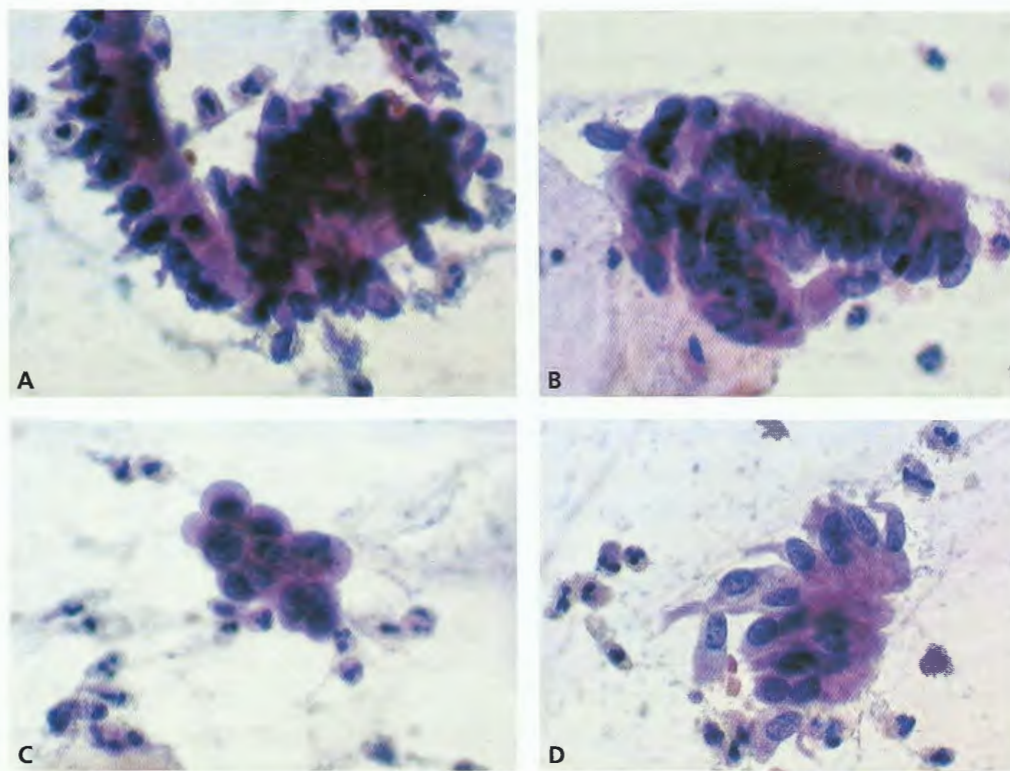



Figura 12.26 – (*A* – *D*) Metaplasia tubária: núcleos são geralmente ovais, hipercromáticos. Presença de placas terminais e cílios.

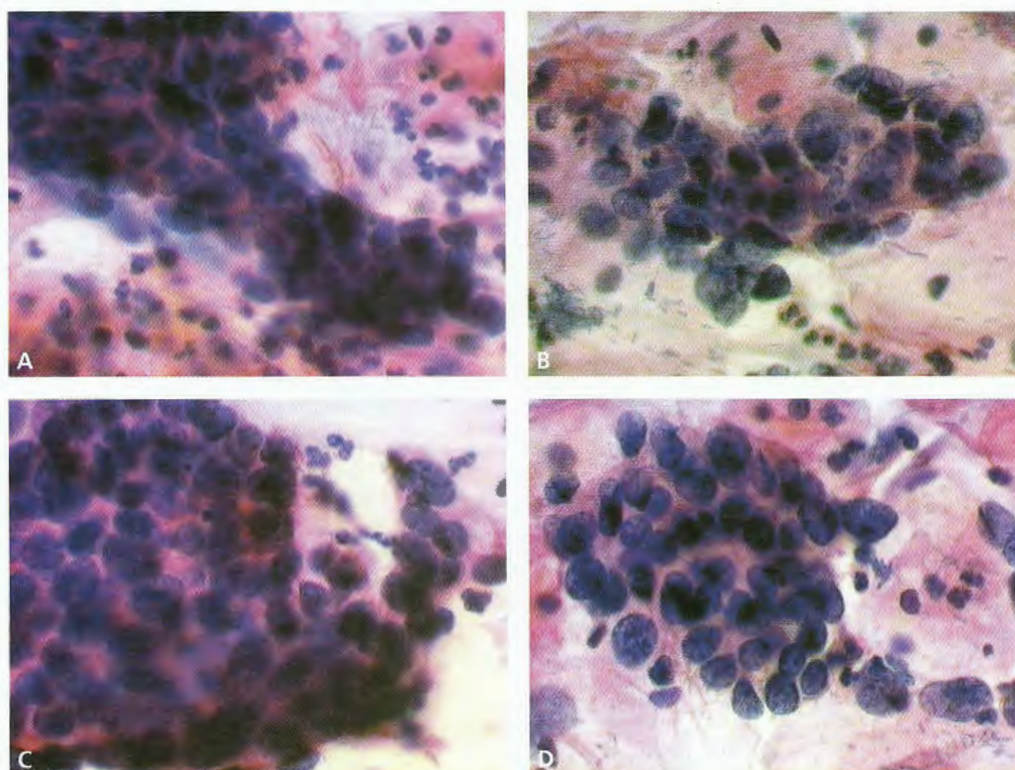



Figura 12.27 – (*A* – *D*) HSIL envolvendo glândulas endocervicais: grupamentos celulares mostrando sobreposição e apinhamento. Perda de polaridade, achatamento de células na periferia dos grupamentos.

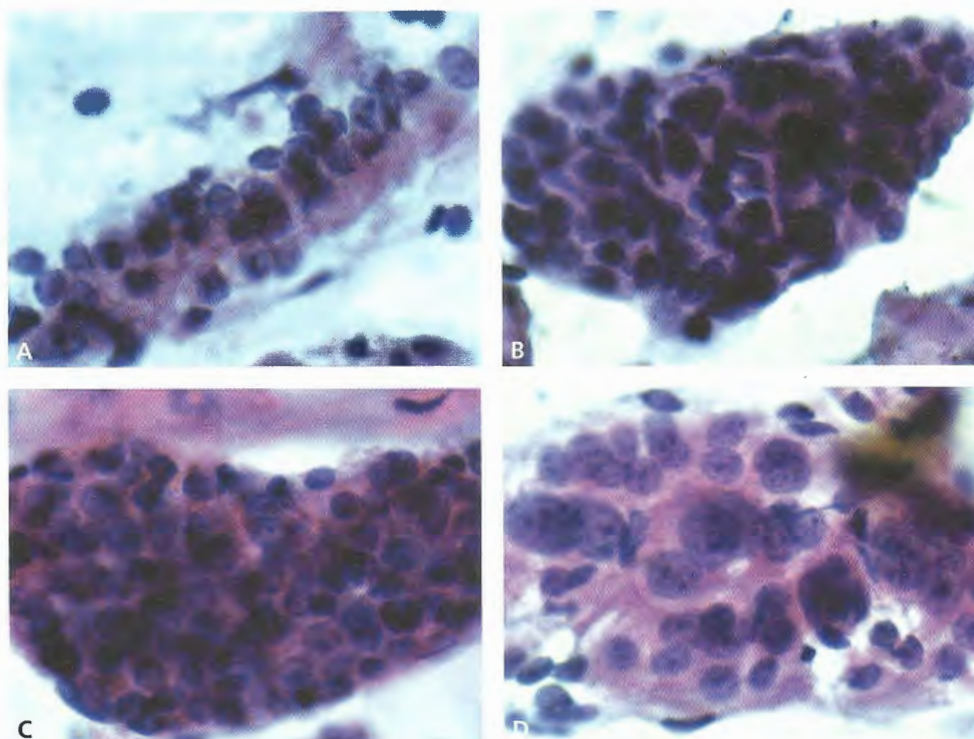



Figura 12.28 – (*A* – *D*) HSIL envolvendo glândulas endocervicais: a Figura *A* mostra células com configuração colunar e citoplama delicado. Há também perda de polaridade e achatamento de células na perifeira dos grupamentos. Há maior quantidade de citoplasma na Figura *D*.

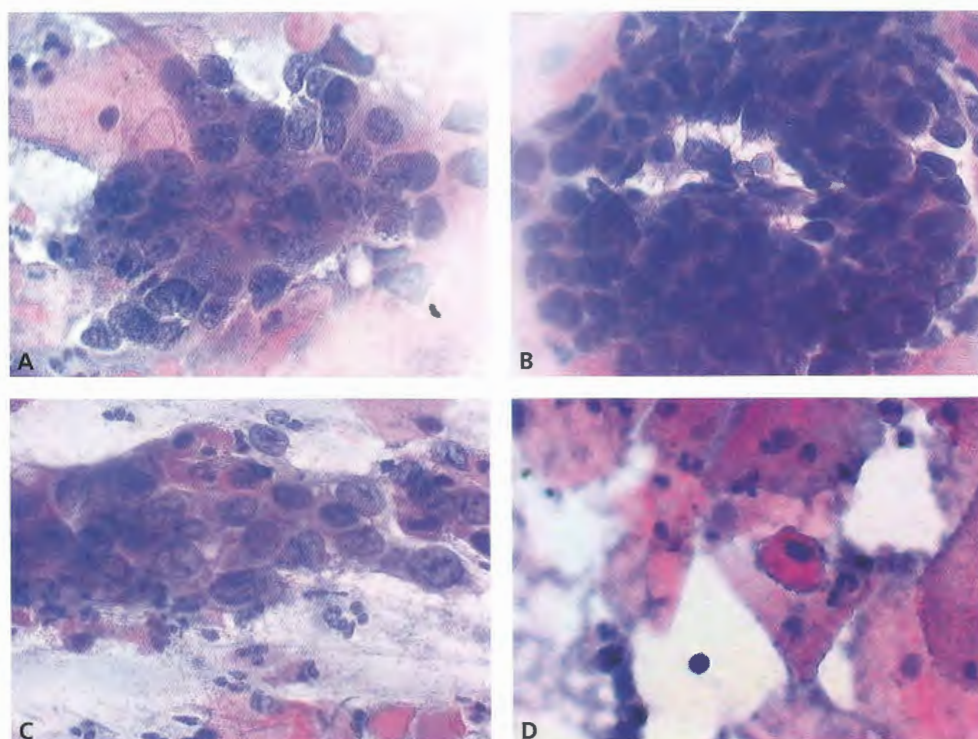



Figura 12.29 – (*A* – *D*) HSIL envolvendo glândulas endocervicais: grupamentos celulares mostrando sobreposição e apinhamento. Perda de polaridade, achatamento de células na perifeira dos grupamentos. Presença de células escamosas disqueratóticas isoladas.

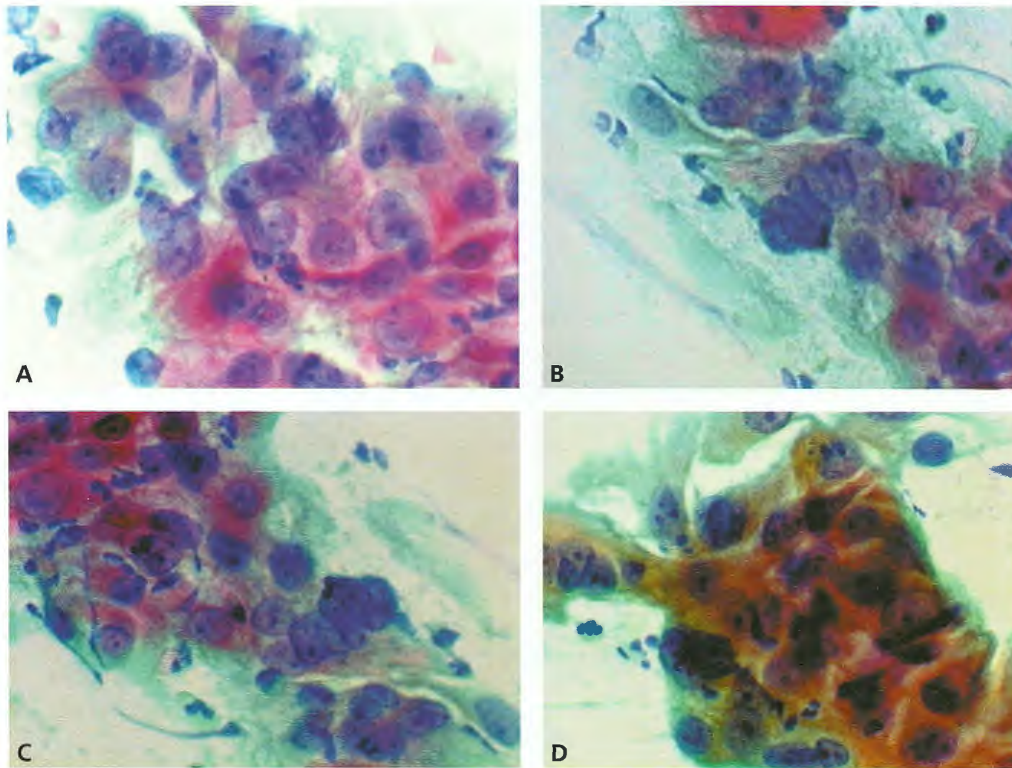



Figura 12.30 – (*A* – *D*) Reparo: lençóis de células coesas lembrando células metaplásicas. As células e os núcleos variam em tamanho, citoplasma vacuolado. Nucléolos evidentes.

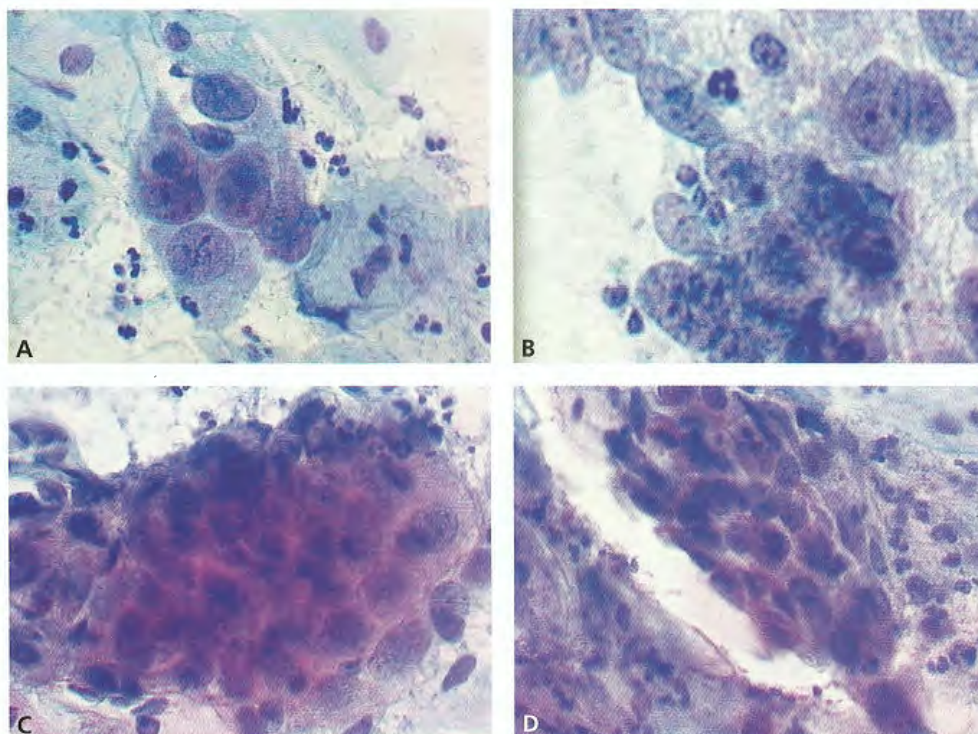



Figura 12.31 – (*A* – *D*) Carcinomas escamosos invasores não queratinizantes podem simular adenocarcinomas. Presença de células com citoplasma frágil, núcleos com cromatina granular e pequenos nucléolos.

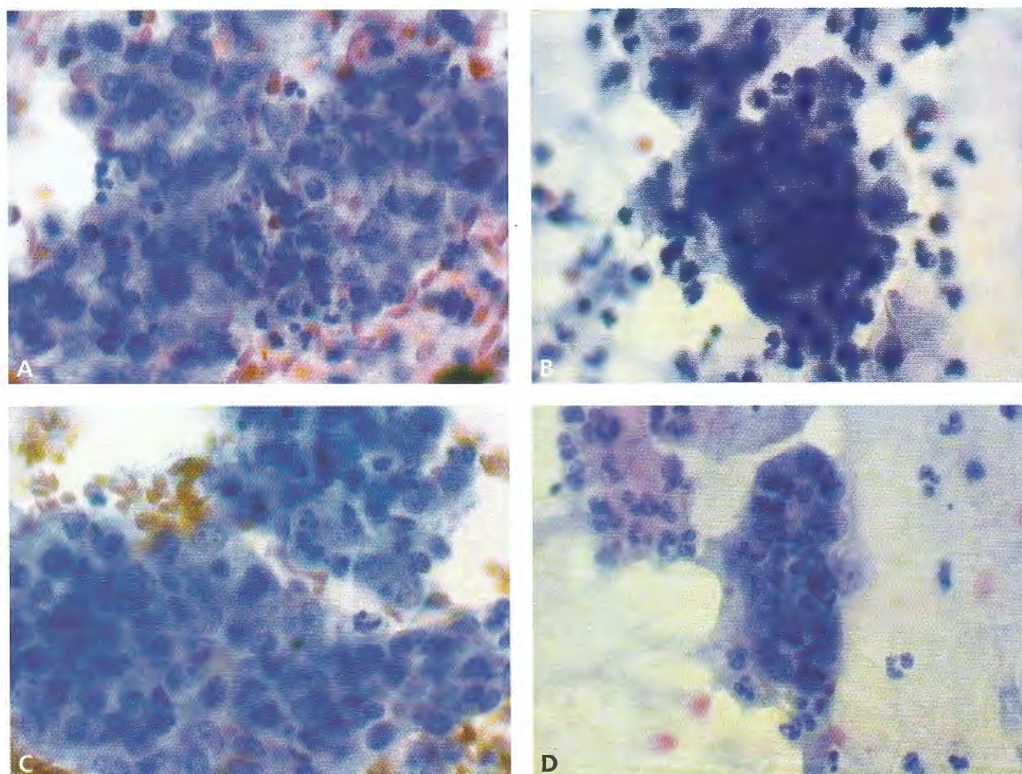



Figura 12.32 – (*A* – *D*) Adenocarcinoma endometrial: células pequenas de configuração esférica. Nucléolos pouco evidentes, cromatina grosseira. Presença de fagocitose de polimorfonucleares.

IMPORTÂNCIA DE CRITÉRIOS CITOMORFOLÓGICOS INDIVIDUAIS

As anormalidades em células glandulares representam desafios diagnósticos em citologia ginecológica. Neoplasias escamosas de alto grau (NIC II e NIC III) são mais frequentemente diagnosticadas do que lesões glandulares na avaliação histológica das mulheres com AGC, ao passo que neoplasias glandulares são mais frequentes em mulheres com diagnóstico citológico de AIS. O diagnóstico citológico baseia-se em um conjunto de critérios citomorfológicos citoplasmáticos e nucleares. O melhor entendimento sobre a associação entre os critérios citomorfológicos presentes em esfregaços de mulheres com AGC e AIS diagnóstico histológico é importante para a melhoria da citologia cervical como teste de rastreamento.

Existem vários critérios citomorfológicos em esfregaços cervicais convencionais sugestivos de AGC ou AIS fortemente associados a um diagnóstico histológico de neoplasias escamosas ou glandulares. Há indicações de que a presença de células mostrando citoplasma eosinofílico, opaco, denso e núcleo hipercromático, denominadas células disqueratóticas, auxilia na definição de uma lesão como escamosa. Os critérios citomorfológicos diferenciais para lesões glandulares foram volume citoplasmático diminuído, membranas nucleares irregulares e presença de nucléolos. Rabelo-Santos *et al.*[25] demonstraram que o aumento da relação núcleo/citoplasma, citoplasma diminuído, alta celularidade, bordas citoplasmáticas indistintas, cromatina grosseiramente granular e perda de polaridade estavam significativamente associados a neoplasias escamosas. Plumagem mostrou-se critério altamente eficaz em distinguir neoplasia glandular de neoplasia escamosa e diagnósticos não neoplásicos. A roseta é um critério arquitetural clássico para o diagnóstico citológico de AIS[4,25], contudo não foi considerado critério independente para distinguir neoplasia glandular de neoplasia escamosa.

Algumas formações de roseta podem ser vistas em diagnósticos não neoplásicos como hiperplasia endometrial e em neoplasias escamosas. De fato, neoplasia intraepitelial escamosa de alto grau em glândulas pode mostrar formação de glândulas rudimentares ou estruturas microacinares imitando neoplasias glandulares[4,25].

Outro critério frequentemente relatado em AIS, as tiras pseudoestratificadas, raramente foi observado em mulheres com diagnóstico histológico de neoplasia escamosa, entretanto apareceu com relativa frequência em diagnósticos não neoplásicos. Os autores levantaram a hipótese de que o achado desse critério seria mais relevante para distinguir neoplasia glandular de neoplasia escamosa[25]. Células de metaplasia tubária podem mostrar núcleos aumentados e hipercromáticos e tiras pseudoestratificadas semelhantes às observadas em AIS. Além disso, paliçada periférica de células e pseudoestratificação de núcleos na borda do grupamento poderiam representar HSIL em glândulas[4,25]. A presença de grupamentos papilares também mostrou-se significativamente associado ao diagnóstico histológico de neoplasia glandular[25].

CONDUTAS CLÍNICAS, PERTINÊNCIA DOS TESTES PARA HPV E POTENCIAL DAS VACINAS

Recomenda-se colposcopia com amostragem endocervical a mulheres com todas as subcategorias de AGC. Avaliação endometrial é recomendada, em conjugação com colposcopia e citologia do colo uterino, a mulheres com 35 anos ou mais, assim como àquelas mais jovens, com indicações clínicas sugestivas de risco para neoplasia endometrial[21].

O espectro de neoplasia relacionado com AGC justifica as múltiplas modalidades de testes para avaliação inicial das mulheres com esse diagnóstico[21]. As diretrizes do Consenso de 2006 consideram o uso do teste para HPV, isoladamente ou associado à repetição de esfregaços cervicais, inaceitável para triagem inicial de todas as subcategorias de AGC e AIS, mas incluiu teste HPV, em associação com a colposcopia, e amostragem endometrial em uma avaliação inicial. É interessante observar que, na versão de 2002, as diretrizes do Consenso consideraram que os dados eram limitados para avaliar o impacto do teste de DNA HPV nas mulheres com AGC e, portanto, nenhuma recomendação foi estabelecida.

Neoplasia do colo uterino, principalmente de origem escamosa, é o diagnóstico mais frequente de neoplasia detectada em mulheres referenciadas por anormalidades glandulares endocervicais. Portanto, considerando o papel do HPV na carcinogênese do colo uterino, o valor do teste do HPV na abordagem clínica das mulheres com esse diagnóstico citológico tem despertado a atenção para investigação[12]. Sharpless *et al.*[27], em uma extensa revisão de literatura, indicaram que o teste HPV tem sensibilidade de 90% e especificidade de 79% para detectar lesões significativas. Os valores preditivos positivo e negativo indicados por esses autores foram de 53% e 97%. Schnatz *et al.*[28] observaram que a sensibilidade do teste HPV em mulheres com AGC, para detectar lesões significantes associadas ao vírus, foi de 81,3%. Chen *et al.*[29] também observaram taxas de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo de, respectivamente, 91%, 91,2%, 62% e 98,4%.

Há algumas evidências de que as mulheres com AGC citológico e teste HPV negativo tendem a apresentar anormalidades endometriais, ao passo que aquelas com teste HPV positivo, anormalidades escamosas ou glandulares cervicais. Além disso, a idade é um fator-chave na determinação da frequência e do tipo de neoplasia detectada em mulheres com AGC. Há maior risco de NIC II, NIC III e AIS em mulheres pré-menopausadas, uma vez que estas possuem menor risco de hiperplasia e adenocarcinoma endometrial[26-28].

Nesse contexto, a idade à apresentação clínica poderia indicar a conduta apropriada a mulheres em faixa etária mais avançada. Por outro lado, o teste HPV poderia indicar onde a abordagem inicial precisaria ser concentrada: em cérvice, endométrio ou tuba uterina. De fato, o teste HPV,

no momento da colposcopia em mulheres com AGC, nas quais não tenha sido observada qualquer anormalidade colposcópica, pode ser útil para indicar aquelas de maior risco de serem portadoras de lesão cervical clinicamente significante, embora a possibilidade de lesões endometriais deva ser sempre considerada.

Em relação ao potencial das vacinas no contexto da prevenção dessa neoplasia, duas vacinas profiláticas contra o HPV são licenciadas em diversos países. As vacinas mostraram-se altamente eficazes na prevenção da persistência da infecção pelo HPV. Considerando-se que há indicações de que a proporção de casos de adenocarcinoma atribuíveis aos tipos 16 e 18 é maior do que o relatado para carcinoma de células escamosas[6], a perspectiva é que mais de 90% dos adenocarcinomas de colo de útero poderiam ser prevenidos pela vacina.

Referências

1. SMITH, H. O.; TIFFANY, M. F.; QUALLS, C. R. et al. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States: a 24-year population based study. **Gynecol. Oncol.**, v. 78, p. 97-105, 2000.
2. VIZCAINO, A. P.; MORENO, V.; BOSCH, F. X. et al. International trends in the incidence of cervical cancer: I. Adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinomas. **Int. J. Cancer**, v. 75, n. 4, p. 536-545, 1998.
3. CASTELLSAGUE, X.; DIAZ, M.; DE SANJOSE, S. et al. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 98, p. 303-315, 2006.
4. COVELL, J. L.; WILBUR, D. C.; GUIDOS, B. et al. Epithelial abnormalities: glandular. In: SOLOMON, D.; NAYAR, R (Eds.). **The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology:** definitions, criteria and explanatory notes. New York: Springer, 2004. p. 123-156.
5. HERZOG, T. J.; MONK, B. J. Reducing the burden of glandular carcinomas of the uterine cervix. **Am. J. Obstet. Cancer**, v. 1, n. 100, Suppl. 5, p. 1035-1044, 2004.
6. WANG, S. S.; SHERMAN, M. E.; HILDESHEIM, A. et al. Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976-2000. **Cancer**, v. 1, n. 100, Suppl. 5, p. 1035-1044, 2004.
7. RUBA, S.; SCHOOLLAND, M.; ALLPRESS, S. et al. Adenocarcinoma "in situ" of the uterine cervix: screening and diagnostic errors in Papanicolaou smears. **Cancer**, v. 102, p. 280-287, 2004.
8. PLAXE, S. C.; SALTZSTEIN, S. L. Estimation of the duration of the preclinical phase of cervical adenocarcinoma suggests that there is ample opportunity for screening. **Gynecol. Oncol.**, v. 75, p. 55-61, 1999.
9. SHERMAN, M. E.; WANG, S. S.; CARREON, J. et al. Mortality trends for cervical squamous and adenocarcinoma in the United States: relation to incidence and survival. Cancer, v. 103, p. 1258-1264, 2005.
10. EIFEL, P. J.; BURKE, T. W.; MORRIS, M. et al. Adenocarcinoma as an independent risk factor for disease recurrence in patients with stage IB cervical carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, v. 59, p. 38-44, 1995.
11. DE SANJOSE, S.; QUINT, W. G.; ALEMANY, L. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **Lancet Oncol.**, v. 11, n. 11, p. 1048-1056, 2010.
12. RABELO-SANTOS, S. H.; DERCHAIN, S. F. M.; VILLA, L. L. et al. Human papillomavirus-specific genotypes in cervical lesions of women referred for smears with atypical glandular cells or adenocarcinoma "in situ". **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v. 28, p. 272-278, 2009.
13. BURK, R. D.; MASANORI, T.; GRAVITT, P. E. et al. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. **Cancer Res.**, v. 63, p. 7215-7220, 2003.
14. YAMADA, T.; MANOS, M. M.; PETO, J. et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. **J. Virol.**, v. 71, p. 2463-2472, 1997.
15. ONG, C. K.; CHAN, S. Y.; CAMPO, M. S. et al. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. **J. Virol.**, v. 67, p. 6424-6431, 1993.
16. RABELO-SANTOS, S. H.; VILLA, L. L.; DERCHAIN, S. F. et al. Variants of human papillomavirus types 16 and 18: histological findings in women referred for atypical glandular cells or adenocarcinoma "in situ" in cervical smear. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v. 25, p. 393-397, 2006.
17. BERUMEN, J.; ORDONEZ, R. M.; LAZCANO, E. et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 5, n. 93, p. 1325-1330, 2001.
18. MADELEINE, M. M.; DALING, J. R.; SCHWARTZ, S. M. et al. Human papillomavirus and longterm oral contraceptive use increase the risk of adenocarcinoma "in situ" of the cervix. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 10, p. 171-177, 2001.
19. DEMAY, R. M. The pap smear. In: **The Art and the Science of Cytopathology**. Chicago: ASCP Press, 1996. p. 61-185.
20. MITCHELL, H.; HOCKING, J.; SAVILLE, M. Improvement in protection against adenocarcinoma of the cervix resulting from participation in cervical screening. **Cancer**, v. 99, p. 336-341, 2003.
21. WRIGHT, T. C. JR.; MASSAD, L. S.; DUNTON, C. J. et al. 2006 American Society for Colposcopy and Cervical Pathology-sponsored Consensus Conference. 2006 Consensus Guidelines for the Management of Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia or Adenocarcinoma "in situ". **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 197, n. 4, p. 346-355, 2007.
22. WESTIN, M. C.; DERCHAIN, S. F.; RABELO-SANTOS, S. H. et al. Atypical glandular cells and adenocarcinoma "in situ" according to the Bethesda 2001 classification: cytohistological correlation and clinical implications. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 139, p. 79-85, 2008.
23. KOSS, L.; MELAMED, M. **Koss' Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases**. 5. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005, p. 282-394. Cap. 11.

24. TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, P. (Eds.). **World Health Organization of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**. Lyon: IARC Press, 2003, p. 259-287. Cap. 5.
25. RABELO-SANTOS, S. H.; DERCHAIN, S. F.; WESTIN, M. C. Endocervical glandular cell abnormalities in conventional cervical smears: cytomorphologic criteria and HPV test for the prediction of glandular neoplasia. **Cytopathology**, v. 19, p. 34-43, 2008.
26. WILBUR, B. The cytology of endocervix, endometrium and upper female genital tract. In: BONFIGLIO, T. A.; EROZAN, Y. S (Eds.). **Gynecologic Cytopathology**. Philadelphia: Lippincot-Raven, 1997. p. 17-144.
27. SHARPLESS, K. E.; O'SULLIVAN, D. M.; SCHNATZ, P. F. The utility of human papillomavirus testing in the management of atypical glandular cells on cytology. **J. Low Genit. Tract Dis.**, v.13, n. 2, p. 72-78, 2009.
28. SCHNATZ, P. F.; SHARPLESS, K. E.; O'SULLIVAN, D. M. Use of human papillomavirus testing in the management of atypical glandular cells. **J. Low Genit. Tract Dis.**, v. 13, n. 2, p. 94-101, 2009.
29. CHEN, L.; YANG, B. Assessment of reflex human papillomavirus DNA testing in patients with atypical endocervical cells on cervical cytology. **Cancer**, v. 114, p. 236-241, 2008.
30. HARPER, D. M. Currently approved prophylactic HPV vaccines. **Expert Rev. Vaccines**, v. 8, n. 12, p. 1663-1679, 2009.

Capítulo 13

Controle de Qualidade

Rita Goreti Amaral
Rita Maria do Amparo Bacelar Palhano

INTRODUÇÃO

O método mais amplamente utilizado para rastreamento do câncer do colo do útero é o teste de Papanicolaou (exame citopatológico). O rastreamento do câncer do colo do útero baseia-se na história natural da doença e no reconhecimento de que o câncer invasivo evolui a partir de lesões precursoras (lesões intraepiteliais escamosas de alto grau e adenocarcinoma *in situ*), que podem ser detectadas e tratadas adequadamente, impedindo a progressão para o câncer.

Os laudos são elaborados a partir de critérios citopatológicos expressos em graus de alterações citomorfológicas, que possibilitam classificar os esfregaços em categorias que variam desde esfregaços dentro do limite da normalidade, inflamatório, atípico, pré-neoplásicos e com alterações neoplásicas.

Em conformidade com a legislação brasileira (RDC 302/2005 ANVISA), todo laboratório clínico deve ter um programa de controle interno e externo da qualidade[1].

O controle de qualidade faz parte de um sistema de gestão que tem como fim o monitoramento da imprecisão e exatidão ou acurácia do processo analítico, prevenindo sua deterioração.

A metodologia empregada na elaboração do controle interno e externo da qualidade depende do tipo da análise em questão. Nas análises quantitativas, são utilizados métodos estatísticos como o desvio padrão. Nas análises qualitativas, são empregadas outras metodologias. O exame citopatológico é uma análise qualitativa.

No controle interno da qualidade, o laboratório monitora internamente o erro aleatório, a imprecisão do sistema analítico, utilizando suas próprias ferramentas.

Toda a equipe que realiza a rotina do laboratório deve estar sensibilizada e capacitada para realizar a análise crítica da imprecisão e, caso seja necessário, aplicar ações corretivas antes da liberação do exame. Para tanto, a lista de verificação da Sociedade Brasileira de Citologia Clínica apresenta itens considerados de maior importância e indispensáveis ao funcionamento do laboratório e ajuda o citologista a elaborar seu programa de controle da qualidade[2].

A imprecisão traduz-se na incapacidade de se reproduzir sempre resultados da mesma forma. Nas análises qualitativas, a imprecisão é avaliada por meio de metodologias que estabelecem limites que serão avaliados mediante o coeficiente de variação da primeira e segunda leituras dos esfregaços e critérios de aceitabilidade avaliados segundo a consistência clínica.

O controle externo da qualidade preocupa-se com o erro sistemático, avalia a exatidão do ensaio, i. e., a precisão de uma operação analítica, tendo como objetivo a liberação de resultados corretos. Nas análises qualitativas, são comparados os resultados entre laboratórios, bem como os materiais dos ensaios de proficiência.

Os ensaios de proficiência, em citopatologia, utilizam fotomicrografias de casos selecionados por profissionais especializados. Nesse caso, o laboratório solicita a avaliação individual de sua equipe de citologistas e envia uma das avaliações ao programa de controle da qualidade. Ele guarda as avaliações dos outros profissionais e, somente após receber o resultado do programa de proficiência, reúne a equipe para reavaliar as não conformidades.

Considerando-se que o monitoramento interno e externo da qualidade diminui as taxas de resultados falso-negativos, torna-se necessária a padronização metodológica da execução de exames nessa área do laboratório clínico, a fim de que ações corretivas possam ser aplicadas para garantir a acurácia do diagnóstico citopatológico[3]. Dessa forma, programas de controle da qualidade visam assegurar a manutenção de um nível elevado de atuação do laboratório e reduzir as probabilidades de erro, bem como de suas consequências clínicas e legais.

PROFISSIONAIS HABILITADOS PARA O EXERCÍCIO DA CITOPATOLOGIA

Farmacêutico, Médico e Biomédico são profissionais da saúde, reconhecidos pela legislação brasileira, com competência legal para exercer responsabilidade técnica por laboratório clínico especializado em citopatologia, bem como para realizar exames citopatológicos.

As normas que regulamentam a atividade profissional farmacêutica no Brasil são: Lei Federal nº 3.820/60; Lei Federal nº 5.991/73; Decretos do Governo Provisório nº 20.377/31 e 20.931/32 e, também, Decreto Federal Regulamentador nº 85.878/81. Há também resoluções do Ministério da Educação, por meio do Conselho Nacional de Educação, por intermédio de sua Câmara de Educação Superior, que tratam da formação profissional do farmacêutico, mediante o Parecer CNE/CES nº 1.300, de 6 de novembro de 2001, e a Resolução CNE/CES nº 02, de 19 de fevereiro de 2002.

Quanto à atividade profissional da Medicina no Brasil, destacam-se as Leis Federais nº 3.268/57 e nº 11.000/2004, o Decreto do Governo Provisório nºs 20.931/92 e o Decreto Federal Regulamentador nº 44.045/58. No âmbito do Ministério da Educação, por meio do Conselho Nacional de Educação, por intermédio da sua Câmara de Educação Superior, que tratam da formação profissional do médico, têm-se o Parecer CNE/CES nº 1.133, de 7 de agosto de 2001, e a Resolução CNE/CES nº 4, de 7 de novembro de 2001.

Quanto à atividade profissional da Biomedicina no Brasil, destacam-se as Leis Federais nºs 6.684/79 e 7.017/83 e o Decreto Federal Regulamentador nº 88.439/83. No âmbito do Ministério da Educação, por meio do Conselho Nacional de Educação, por intermédio da sua Câmara de Educação Superior, que tratam da

978-85-4120-024-0

formação profissional do biomédico, tem-se o Parecer CNE/CES nº 104, de 13 de março de 2002, e Resolução CNE/CES nº 2, de 18 de fevereiro de 2003.

É importante ressaltar que o Ministério da Saúde, por meio da Portaria nº 1.230/99 MS, inclui o farmacêutico e o biomédico (analista clínico) especialista em citopatologia na tabela de procedimentos SIA/SUS, publicada no Diário Oficial nº 182/1994, Seção 1, p. 14.328 "603-3", justamente se considerando a revisão das diretrizes curriculares de todos os cursos superiores no Brasil, em especial aqueles da área da saúde, conforme determinação da Lei Federal nº 9.394/96 (Lei de Diretrizes e Bases da Educação Nacional).

A questão da qualidade dos exames citopatológicos também é objeto de atos normativos estatais, com atos dos gestores federais, estaduais e municipais. É relevante frisar a portaria conjunta SPS/SAS (Ministério da Saúde/Secretaria de Assistência à Saúde) nº 92/2001[4], que trata do monitoramento da qualidade dos exames no âmbito do SUS, e o Regulamento Técnico para o Laboratório Clínico RDC 302/2005-MS[1], que determina a obrigatoriedade do controle interno e externo da qualidade dos exames realizados. Ele também obriga o laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial a possuírem um profissional legalmente habilitado como responsável técnico.

No Brasil, o exercício profissional é livre, atendidas as qualificações profissionais que a lei estabelecer, conforme regra do artigo 5º, inciso XIII da Constituição Federal, inexistindo qualquer dúvida acerca da competência profissional para realização de exames citopatológicos atribuída a todas as profissões supracitadas, em especial à Farmácia. É certo que pode haver questionamentos relacionados a insatisfações pontuais de interesses corporativistas e mercadológicos, que tentam mitigar o exercício dos exames citopatológicos pelas profissões de saúde já mencionadas. Todavia, essas pretensões não encontram amparo no Poder Judiciário, já existindo farta jurisprudência a esse respeito, sobretudo considerando que o interesse à saúde tem supremacia em relação a qualquer interesse financeiro, corporativista ou de mercancia, inclusive.

Esclarecidas as atribuições legais da profissão, cabe ao citologista ou citopatologista coordenar sua equipe de trabalho de forma competente, trabalhar em estado da arte, em constante atualização, pertencer a uma sociedade científica específica dessa área do conhecimento e obter o título de especialista por meio de realização de concurso.

Por fim, em relação à sua equipe de colaboradores, deve promover constante treinamento, utilizar metodologias que possam identificar as principais causas de erros e divergências de diagnósticos, realizar educação continuada para uniformizar os critérios citopatológicos, atualizar e melhorar o desempenho no diagnóstico das lesões precursoras e malignas, além de cumprir as normas de controle interno e externo da qualidade e segurança do trabalhador[1].

ORGANIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

O laboratório clínico que realiza exames citopatológicos deve estar limpo, bem iluminado e bem ventilado. A área de preparação de amostras deve estar separada daquela onde os espécimes são avaliados, e os microscópios binoculares devem ser de boa qualidade, em quantidade suficiente e sob um contrato de serviço de manutenção periódica. A organização dos móveis, como mesas e cadeiras dos citologistas, deve ser bem planejada para garantir conforto aos profissionais e resguardá-los de riscos ergonômicos. As salas devem ser dimensionadas conforme a RDC 50/2002 da ANVISA[5,6].

Para garantir a rastreabilidade, o laboratório deve dispor de um sistema de informática que permita identificar a hora do recebimento e/ou coleta da amostra, o nome do funcionário que efetuou a coleta ou recebeu a amostra e identificá-la por ordem numérica e anual, para localizar facilmente todo o seu caminho dentro do laboratório, desde a recepção até a emissão do laudo.

O sistema da qualidade deve conter os requisitos para avaliar a qualidade desde a recepção

até o tempo de entrega do resultado do exame. Por isso, é importante acompanhar o atendimento da recepção, realizar pesquisas de opinião sobre o atendimento, disponibilizar urnas para coleta de informações sobre a satisfação do cliente, utilizar gráficos para demonstrar a quantidade e a frequência de solicitação de novas amostras e de queixas sobre a clareza dos resultados[7].

Para se obter essas informações, devem ser utilizados os seguintes indicadores: tempo de atendimento ao cliente; tempo decorrido entre a coleta e o recebimento do material no laboratório; solicitação de novas amostras; satisfação do cliente e queixas sobre o resultado dos exames.

Para facilitar o desenvolvimento das tarefas, deve-se treinar os profissionais envolvidos e, sobretudo, garantir a qualidade do produto (laudo citopatológico), bem como o desempenho de todos aqueles que coordenam e executam as tarefas; é necessário elaborar um conjunto de procedimentos e instruções de trabalho específicos da especialidade de citopatologia[2].

Os procedimentos operacionais são de grande importância na padronização metodológica, uma vez que descrevem as tarefas de maneira detalhada, mostrando, passo a passo, as atividades e definindo objetivos e responsabilidades dentro dos processos técnicos de trabalho[2].

CONTROLE DA QUALIDADE DOS EXAMES CITOPATOLÓGICOS DO COLO DO ÚTERO

O controle da qualidade dos exames citopatológicos do colo do útero deve abranger todas as etapas do processo, desde a coleta, o registro, o processamento técnico do material, a avaliação microscópica e os arquivos até a emissão do laudo dentro dos padrões internacionais de classificação diagnóstica. Devem-se estabelecer parâmetros para medir a efetividade de todas as atividades desenvolvidas, assim como a competência dos profissionais envolvidos[2,8].

Todos os sistemas analíticos apresentam uma imprecisão inerente. O exame citopatológico, como todos os demais exames do laboratório clínico, deve ser monitorado a fim de assegurar a qualidade do procedimento e obedecer ao dispositivo legal do laboratório clínico, a RDC 302/2005 ANVISA[1].

Para melhor compreensão, as etapas foram divididas em pré-analítica, analítica e pós-analítica. Na implantação do sistema da qualidade, o Manual de Boas Práticas deve contemplar não só as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica, dando-se destaque, também, ao controle externo da qualidade dos exames citopatológicos.

Fase pré-analítica

O controle da fase pré-analítica tem como objetivo garantir a representatividade e a qualidade das amostras. Essa fase abrange desde a requisição dos exames até a disponibilização das amostras dos pacientes para fase analítica, i. e., para análise do esfregaço.

Em um laboratório clínico, o erro pré-analítico chega a 68%, o analítico, a 13% e o pós-analítico, a 19%[3].

Observa-se que a fase pré-analítica é responsável pela maioria dos erros dos exames dos laboratórios clínicos. Erros de coleta podem variar de 20 a 68%, ou seja, a habilidade dos profissionais que efetuam a coleta constitui-se no fato mais importante para obtenção de esfregaços satisfatórios[3,9-11].

Recepção das amostras no laboratório

O laboratório deve instruir os funcionários da recepção sobre as informações a serem transmitidas aos pacientes que irão realizar os exames citopatológicos ginecológicos ou não ginecológicos.

É importante que as pacientes sejam informadas, por escrito, das condições ideais para cada tipo de coleta, a fim de se obter uma amostra de boa qualidade.

A paciente deverá ser informada sobre as normas de procedimento para o preparo da coleta, p. ex., a coleta do exame citopatológico cervical deverá ser realizada fora do período menstrual,

978-85-4120-024-0

abstinência sexual de, pelo menos, 48 h, evitar o uso de duchas, lavagens e cremes vaginais etc.

A recepção deve der informada de que as amostras ginecológicas podem ser colhidas mediante coleta convencional de Papanicolaou ou em meio líquido e que os recipientes usados para o acondicionamento do material dependem do tipo das amostras citológicas, assim como do fixador utilizado (p. ex., caixa de papelão, madeiras apropriadas para o transporte dos esfregaços a seco ou aqueles preservados por fixadores de cobertura; tubetes, para os esfregaços fixados em álcool a 96%; tubos com fixador específico, usados na citologia de meio líquido).

Cadastro do material

Antes de realizar o cadastro do material no laboratório, a paciente deverá apresentar a requisição do exame solicitado pelo clínico e um documento que comprove sua identificação (p. ex., carteira de identidade)[1].

Durante o registro do exame, a recepcionista deve observar cuidadosamente a compatibilidade das informações da requisição e da identificação dos frascos e recipientes que contêm as amostras, anotar a quantidade de lâminas e checar as iniciais do nome da paciente nas respectivas lâminas, bem como as condições do material (p. ex., quantidade de fixador sobre a amostra, lâmina quebrada etc.).

A requisição do exame deverá conter os seguintes dados: informações pessoais da paciente (nome, idade); nome do solicitante do exame; tipo de exame (citopatologia cervical – sítio anatômico); data e hora da coleta; dados clínicos pertinentes (p. ex., DUM, data do último exame preventivo, paridade, uso de contraceptivos, referência hormonal – Terapia de Reposição Hormonal – antecedentes de rádio e/ou quimioterapia e resultados cito e histopatológicos prévios).

Após toda a conferência, deve-se cadastrar o material com os seguintes dados[1]: (a) número de registro de identificação da paciente gerado pelo laboratório; (b) nome da paciente; (c) idade e procedência da paciente; (d) telefone e/ou endereço da paciente, quando aplicável; (e) nome e contato do responsável, em caso de menor de idade ou incapacitado; (f) nome do solicitante; (g) data e hora do atendimento; (h) horário da coleta, quando aplicável; (i) exames solicitados e tipo de amostra; (j) quando necessário, informações adicionais, em conformidade com o exame (p. ex., medicamentos em uso, dados clínicos pertinentes etc.); (k) data prevista para a entrega do laudo e (l) indicação de urgência, quando aplicável.

No final do atendimento, a paciente ou seu responsável deve receber um comprovante de atendimento contendo o número de registro, o nome da paciente, a data do atendimento e aquela prevista para a entrega do laudo, a relação de exames solicitados e os dados para contato com o laboratório.

Os laboratórios conveniados pelo SUS, para a realização de exames citopatológicos cervicais, devem seguir as recomendações do Ministério da Saúde[12].

No setor de atendimento e na área técnica, deve haver instruções escritas que estabeleçam os critérios de aceitação e rejeição de amostras, bem como de realização de exame com restrição[12].

Critérios de aceitação e rejeição da amostra

Dentre os critérios de aceitação da amostra, devem-se verificar, p. ex., a identificação correta da lâmina e do frasco; se a identificação da lâmina e do frasco coincide com a requisição; esfregaços corretamente fixados e, em casos de citologia em meio líquido, se a amostra está submersa em solução fixadora adequada.

Dentre os critérios de rejeição da amostra, há, p. ex., dados ilegíveis na identificação do material; falta de identificação ou identificação incorreta da lâmina e/ou do frasco; divergências entre as informações da requisição e do material; material insuficiente ou sem fixação prévia; uso de fixador inadequado e lâmina quebrada[12].

Em caso de rejeição, deve-se fazer o registro das amostras recebidas em condições desfavoráveis, pois o relato da inadequação da amostra é um procedimento fundamental na busca da qualidade.

A causa da rejeição deverá ser identificada, de preferência, no momento da entrada da lâmina no laboratório, devendo seu registro ser feito no SISCOLO. Contudo, é o profissional responsável pelo exame quem assinará o laudo contendo o motivo da rejeição[12].

Transporte

O laboratório deverá fornecer, por escrito, instruções para o transporte das amostras, respeitando a especificidade de cada material biológico, com as condições de temperatura, conservação, integridade e estabilidade da amostra, bem como utilizar recipiente de transporte isotérmico, impermeável e higienizável, identificado com a simbologia de risco biológico e com o nome do laboratório ou posto de coleta responsável.

As amostras devem ser coletadas, fixadas corretamente e enviadas ao laboratório para a realização dos exames citopatológicos. Antes da coleta, a retirada do excesso de secreção do colo do útero, de forma delicada e com habilidade, evita o aparecimento de fatores obscurecíveis, como esfregaços com áreas espessas inadequadas à avaliação citopatológica[14].

Os esfregaços fixados com fixadores úmidos (etanol a 96%) devem permanecer individualmente em seus respectivos tubetes, os quais devem ser acondicionados em embalagens que garantam não derramar e evaporar o fixador. É imprescindível a identificação com o nome da paciente e da unidade responsável pelo encaminhamento. Após ser coletado, o material deverá ser enviado o mais rápido possível ao laboratório, respeitando-se sua integridade e conservação.

As amostras fixadas por álcool a 96% mantêm-se em boa conservação por uma ou mais semanas. Já aquelas em que foram utilizados fixadores de camada (propilenoglicol e etanol) conservam-se por apenas uma semana[15].

As amostras em meio líquido podem ser armazenadas em temperatura ambiente por até 60 dias, sendo o *pellet* estável por até 14 meses[16].

As amostras a serem enviadas a laboratórios distantes do local da coleta devem ser fixadas com fixadores de cobertura (propilenoglicol ou similar) à temperatura ambiente e acondicionadas individualmente em pequenas caixas de papelão, corretamente identificadas com o nome da paciente e da unidade responsável pelo encaminhamento (ver *Critérios de aceitação e rejeição da amostra*). Devem-se seguir as normas de biossegurança no transporte desses materiais.

Em casos de intercorrências no transporte de amostras biológicas, devem-se seguir os protocolos de urgência e emergência. Se houver algum acidente durante o transporte das caixas com o material fixado – se o prejuízo for a perda do material por quebra da lâmina, por exemplo –, o funcionário deverá recolher as lâminas com luvas apropriadas para evitar ferimento. O fato deve ser comunicado ao responsável e ao setor de triagem, que verificarão a situação do material. Caso as amostras não estejam em condições para exame, o responsável deverá solicitar nova coleta. As amostras líquidas devem ser transportadas em caixas térmicas para evitar mudança de temperatura.

Em caso de acidentes em que ocorra quebra ou espalhamento do material biológico no veículo e nas proximidades, o motorista deverá estar munido de luvas, recipiente rígido, hipoclorito de sódio, sacos plásticos e telefone móvel para informar imediatamente a empresa e receber apoio e esclarecimentos necessários. Em casos de não abertura da maleta térmica, o setor da triagem verificará a situação do material. Havendo perda de algum material, deve-se informar o responsável pelo setor da coleta. Em casos de abertura da maleta térmica, em que o material tenha se espalhado, deve-se jogar hipoclorito de sódio no local e retirar o material, colocando-o dentro de recipiente adequado para que seja feita a verificação, por um técnico, das possíveis perdas e consequentes recoletas.

É importante seguir as normas de segurança para que não ocorra troca de material. Portanto, cada amostra deve ser fixada e acondicionada individualmente, as lâminas devem ser identificadas no momento da coleta para assegurar a identidade da amostra e os recipientes usados para o acondicionamento do material devem ser identificados para evitar troca de material.

Durante a conferência realizada na recepção, caso existam dúvidas, os funcionários deverão solicitar ajuda do técnico de nível superior responsável pela realização do exame.

Processamento da amostra

Após a conferência do material, as amostras são submetidas a coloração. Devem-se, então, identificar os tipos de amostras (p. ex., esfregaços ginecológicos ou esfregaços não ginecológicos). As amostras recebem um número de registro específico do setor de citologia. Os esfregaços ginecológicos convencionais fixados em álcool seguem para a bateria de coloração. Os esfregaços fixados com fixadores de cobertura, antes da coloração, devem ser submetidos a banhos com álcool a 96% para eliminar a película de cobertura. As amostras em meio líquido são submetidas à técnica específica de preparação de esfregaço.

978-85-4120-024-0

A coloração de Papanicolaou, universalmente utilizada em citopatologia ginecológica, é constituída de um corante nuclear natural, a hematoxilina, e dois citoplasmáticos, *Orange* G e EA 36 ou EA 50. A qualidade da coloração depende da qualidade da preservação celular e da fixação do espécime, dos reagentes, bem como do protocolo da coloração e da montagem.

Para se obter uma coloração de qualidade, é necessário checar diariamente (mediante análise microscópica), fazendo as correções necessárias, p. ex., a troca de soluções (corantes) da bateria, que dependerá do número de lâminas processadas diariamente. Recomenda-se que a troca dos corantes seja feita após a coloração de mais ou menos 2.000 lâminas[8].

As soluções da bateria devem ser filtradas, no mínimo, uma vez por semana (ou mais, a depender do volume de lâminas coradas), para evitar que as células que se desprendem de um esfregaço possam contaminar os demais.

A hematoxilina de Harris deve ser filtrada antes da primeira coloração do dia, para evitar que o precipitado do corante sobre as células atrapalhe a leitura do esfregaço.

Devem-se corar as amostras ginecológicas e as não ginecológicas separadamente, para evitar que as células que se desprendem de um esfregaço contaminem os outros.

O laboratório deve ter um protocolo de descarte das substâncias utilizadas na bateria de coloração. Para isso, ele deve solicitar ao fabricante a ficha técnica dos produtos para que o descarte seja feito de acordo com o tipo de resíduo aos quais pertencem. Nesse caso, deve-se seguir o PGRSS, RDC 306/2004 ANVISA[17].

As substâncias químicas apresentam o número do lote do fabricante. Por ocasião de cada troca de lote, o produto deve ser validado. No caso, a cada troca da bateria de coloração e a cada troca de lote dos reagentes, o citologista deve atestar a qualidade da coloração das lâminas coradas. Deve-se lembrar que é expressamente vedado o uso de produtos com data de validade vencida.

Os produtos xilol, entellan, hematoxilina, EA 36 ou EA 50 e *Orange* G devem ser descartados na categoria de resíduos químicos, conforme o PGRSS do laboratório. Esses produtos não podem ser descartados no ralo da pia de apoio da sala de coloração.

Após a coloração, é realizada a montagem da lâmina, cujo objetivo é permitir a ligação entre a lâmina e a lamínula e proteger o material celular de dessecação e retração. O meio de montagem age como um efetivo selador contra o oxigênio, prevenindo o desbotamento do corante.

Os meios de montagem mais utilizados são o bálsamo do canadá e o Entellan. Recomenda-se não utilizar "verniz", pois os produtos para diagnóstico *in vitro*, reagentes e insumos adquiridos devem estar regularizados na ANVISA/MS, de acordo com a legislação vigente[1].

Fase analítica

A rotina de exames citopatológicos em um laboratório de análise clínicas, em sua maioria, é a citologia ginecológica, porém medidas de garantia da qualidade devem ser aplicadas em ambos os espécimes: ginecológicos e não ginecológicos.

No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio da Secretaria de Políticas de Saúde e Secretaria de Assistência à Saúde, instituiu a Portaria SPS/SAS

nº 92/2001, de 16 de outubro de 2001, que determina a realização do monitoramento interno e externo da qualidade dos resultados de exames citopatológicos do colo do útero para os laboratórios que realizam esses exames para o SUS[4].

Em 2005, o Ministério da Saúde, por meio da ANVISA, instituiu a RDC nº 302, que dispõe sobre o regulamento técnico para funcionamento de laboratórios clínicos públicos e privados, bem como sobre a execução do controle interno e externo da qualidade[1].

O controle interno da qualidade dos exames citopatológicos do colo do útero na fase analítica tem como objetivo reduzir as taxas dos resultados falso-negativos e falso-positivos, causados por erros de escrutínio ou de interpretação de diagnóstico, e prover meios para o laboratório assegurar o melhor serviço possível aos clientes[7,12].

Análise microscópica dos esfregaços citopatológicos

Trata-se da análise cuidadosa (escrutínio) de todos os campos do esfregaço, relatando todos os aspectos que devem ser observados para a elaboração de um laudo dentro dos padrões de qualidade.

Inicialmente, devem-se verificar as condições do microscópio (fonte de luz, diafragma etc.) e conferir o número de registro da(s) lâmina(s) e iniciais do nome da paciente com o formulário de requisição ou solicitação do exame. É importante conferir os dados da paciente (idade, DUM etc.) e informações clínicas, caso sejam informadas pelo profissional responsável pela coleta[12,13].

Após toda essa conferência, deve-se realizar uma avaliação do esfregaço com a objetiva de pequeno aumento para verificar a qualidade da amostra, observando-se também a qualidade da coloração e a distribuição do material a ser examinado. Em seguida, inicia-se o escrutínio minucioso de todos os campos do esfregaço com a objetiva de 10×, partindo de uma das extremidades da amostra e percorrendo a lâmina no sentido horizontal ou vertical, fazendo um vaivém. Sempre que necessário, para observação de detalhes e critérios citomorfológicos, utiliza-se a objetiva de 40×. Preconiza-se a leitura sob orientação vertical, tendo em vista a menor fadiga visual. Excepcionalmente, se necessário, utilizar a objetiva de imersão.

A avaliação da adequabilidade da amostra é um indicador importante da qualidade. Portanto, deve-se classificar se o esfregaço é satisfatório ou insatisfatório para análise. A presença de células endocervicais e metaplásicas deve ser registrada no laudo. Portanto, de acordo com a Nomenclatura Brasileira e o sistema de Bethesda[13,18], são considerados:

- *Esfregaços satisfatórios*: número adequado de células epiteliais escamosas bem preservadas e bem visualizadas (estimativa mínima de aproximadamente 8.000 a 12.000 células escamosas/coleta convencional); células endocervicais e/ou metaplásicas (mínimo de 10 células endocervicais ou metaplásicas, bem preservadas, isoladas ou em agrupamentos); fatores obscurecedores (sangue, infiltrado leucocitário, áreas espessas, dessecamento, artefatos de estiramento, citólise e contaminação) que prejudiquem a interpretação de aproximadamente 50 a 75% das células epiteliais.
- *Esfregaços insatisfatórios*: celularidade (menos de 10% da superfície da lâmina recoberta por células escamosas); fatores obscurecedores (sangue, infiltrado leucocitário, áreas espessas, dessecamento, artefatos de estiramento, citólise e contaminação) que prejudiquem a interpretação de, aproximadamente, mais de 75% das células epiteliais, caso não sejam identificadas células anormais.

Em casos de esfregaços com fatores de obscurecimento dificultando a leitura, e, no entanto, se forem observadas células raras suspeitas de alterações pré-malignas ou malignas, esse esfregaço deixa de ser insatisfatório e passa a ser considerado, no mínimo, com atipias de significado indeterminado, dependendo das alterações celulares verificadas[18].

Em casos de esfregaços adequados para análise, porém de difícil interpretação, eles devem ser rigorosamente analisados, uma vez que podem conter sinais ocultos de lesões significativas, até

978-85-4120-024-0

mesmo invasivas. Mesmo que não seja possível alcançar uma conclusão diagnóstica, a presença de agrupamentos celulares malpreservados deve ser relatada de modo descritivo, dividindo assim a preocupação com o clínico[18]. Nos casos de esfregaços com resultados de atipias de significado indeterminado possivelmente não neoplásicas, devem ser destacadas as recomendações do Ministério da Saúde, de acordo com as condutas preconizadas[47].

Os esfregaços devem ser classificados de acordo com a Nomenclatura Brasileira[13]. Após o escrutínio de rotina, os esfregaços citopatológicos devem ser submetidos ao controle interno da qualidade[12].

De acordo com a CLIA-88, nos EUA, o limite máximo de análise é de 100 exames diários. Na Europa, o The European Guidelines on Quality Assurance in Cervical Cancer Screening recomenda que o limite máximo de análise varie de 25 a 80 exames diários. Em alguns países, a carga de trabalho é definida por hora, como é o caso da Alemanha, que estipula 10 exames por hora. Entretanto, é de fundamental importância que cada profissional estabeleça seu próprio limite[5,19,20].

Recomenda-se a leitura de 70 lâminas/profissional como limite máximo em uma jornada diária de 8 h[12]. Essa quantidade deve ser distribuída ao longo do período de escrutínio dos esfregaços citopatológicos na rotina diária do laboratório. Essa recomendação estabelece um limite máximo, que não deve ser utilizado como produtividade mínima pelos empregadores[21].

Controle interno da qualidade — métodos de revisão dos esfregaços

O controle interno da qualidade deve ser realizado regularmente e abrange o monitoramento da adequabilidade da amostra, a observação do tempo de escrutínio, o controle da carga de trabalho, a revisão hierárquica dos esfregaços positivos e a revisão dos esfregaços negativos. Compreende ainda a análise da correlação cito-histológica, a revisão de exames anteriores e o monitoramento estatístico da frequência das lesões e da adequabilidade da amostra[7,22].

Em relação aos profissionais responsáveis pela realização do exame, deve-se observar que a certificação, o teste de proficiência e a educação continuada são considerados partes importantes para qualquer programa de garantia da qualidade[1,12,20]. A qualidade deve ser avaliada a cada passo do processo para identificar oportunidades de melhoria. Além dos processos internos de revisão e análise, são necessárias também a comunicação e a interação entre laboratórios e clínicos, para identificar não conformidades e diminuir problemas relacionados à coleta de amostras citológicas, bem como melhorar a detecção de anormalidades, o que beneficia o seguimento da paciente[12,23].

O laboratório deve monitorar o processo analítico com a finalidade de emitir resultados corretos, assim como no que se refere a tempo e a formato, pois estudos mostram que a maioria dos resultados falso-negativos relacionados a essa fase corresponde a erros de escrutínio e de interpretação das alterações citomorfológicas[24,25].

O *erro de escrutínio* ocorre quando as células alteradas estão representadas no esfregaço, no entanto não foram reconhecidas ou identificadas pelo escrutinador durante o escrutínio de rotina. Os fatores que geralmente levam a esse tipo de erro podem estar relacionados a falta de atenção e concentração, fadiga mental, sobrecarga de trabalho e pouca experiência do profissional[20]. Outros fatores podem ocasionar erro de escrutínio, como esfregaços com células anormais escassas e pequenas[24,25].

O *erro de interpretação* ocorre quando células alteradas foram subclassificadas como benignas. Esse erro é atribuído, principalmente, à experiência insuficiente, bem como a informações clínicas inadequadas[26].

Alguns métodos de revisão dos esfregaços interpretados previamente como negativos são utilizados como controle interno da qualidade[12,25,27,28].

Nos EUA, a CLIA 1988 recomenda a revisão aleatória de 10% dos esfregaços negativos. Os exames reavaliados devem abranger uma parte dos casos de alto risco, segundo os critérios do próprio laboratório[19]. Na Europa, de acordo com o The European Guidelines on Quality Assurance

in Cervical Cancer Screening, todos os esfregaços negativos e insatisfatórios no escrutínio de rotina devem ser rapidamente revisados ou, alternativamente, rapidamente pré-escrutinados[20].

No Brasil, foi publicado recentemente o Manual de Gestão da Qualidade para Laboratório de Citopatologia[12], que descreve os diferentes métodos de revisão que podem monitorar a qualidade dos exames citopatológicos. Dentre eles: revisão de, pelo menos, 10% dos exames realizados na rotina; revisão dos esfregaços selecionados com base em critério clínico de risco; correlação dos resultados citológicos com os resultados histológicos; revisão rápida de 100% dos esfregaços negativos e insatisfatórios e pré-escrutínio rápido de todos os esfregaços.

Cabe ao laboratório implementar, em sua rotina, o método que permita a melhoria da qualidade dos exames citopatológicos do colo do útero, visando à redução dos resultados falso-negativos e falso-positivos, conforme descrito a seguir[12].

Revisão de, pelo menos, 10% dos exames realizados na rotina

Revisam-se, no mínimo, 10% dos exames realizados, que deverão ser selecionados conforme os seguintes critérios: todos os exames insatisfatórios por esfregaços hemorrágicos; casos negativos aleatórios, no mínimo 5% dos exames realizados; todos os casos do roteiro de critérios clínicos (p. ex., hemorragia genital pós-menopausa, sangramento ectocervical de contato, evidências de doenças sexualmente transmissíveis ao exame ginecológico, alterações macroscópicas significativas ao exame especular ou à colposcopia, rádio ou quimioterapia prévia, exame citopatológico anterior com alguma alteração atípica ou pré-maligna ou maligna) e citopatológicos de risco (p. ex., células endometriais em esfregaços na pós-menopausa, esfregaços com atipias escamosas ou glandulares de significado indeterminado, alterações celulares de paraqueratose e disqueratose, alterações celulares por infecção viral, lesões intraepiteliais escamosas de baixo e alto graus, carcinoma escamoso, adenocarcinomas e suas lesões precursoras e outras neoplasias malignas)[12].

Revisão dos esfregaços selecionados por critérios clínicos de risco — mulheres consideradas de "alto risco"

Esse método consiste na revisão de todos os esfregaços negativos no escrutínio de rotina que tenham indicação clínica relevante relatada pelo profissional responsável pela coleta, como hemorragia genital pós-menopausa; sangramento ectocervical de contato; evidência de doenças sexualmente transmissíveis ao exame ginecológico (inclusive HIV); alterações macroscópicas significativas ao exame especular ou à colposcopia; rádio e/ou quimioterapia e exame citopatológico anterior alterado, que podem estar associados com maior risco para neoplasias intraepiteliais ou carcinoma invasivo do colo do útero[12].

Revisão de 100% dos esfregaços

Esse método consiste no duplo escrutínio detalhado de todos os esfregaços, sendo o mais minucioso para reduzir os erros do escrutínio de rotina de interpretação[32]. Potencialmente, essa modalidade de revisão deveria reduzir o maior número de resultados falso-negativos, ainda que consuma maior tempo e recursos[33]. Pelo fato de revisar todos os esfregaços, esse método pode ser utilizado como padrão para avaliar o desempenho de estratégias alternativas de controle interno da qualidade[33].

Revisão rápida de 100% dos esfregaços negativos

Esse método consiste em revisar rapidamente, durante 30 a 120 s, todos os esfregaços previamente classificados como negativos ou insatisfatórios no escrutínio de rotina. Durante a revisão rápida, os esfregaços identificados como suspeitos são posteriormente submetidos a revisão detalhada por um profissional experiente, que determinará o diagnóstico final. Esse método é mais eficiente na detecção de resultados falso-negativos quando comparado com o método de revisão de 10%, além de fornecer indicadores que permitem identificar deficiências específicas de cada escrutinador e planejar programas de educação continuada[25,27-30].

Pré-escrutínio rápido de todos os esfregaços

Esse método consiste no escrutínio rápido de todos os esfregaços, durante um tempo limitado de, no máximo, 120 s, antes do escrutínio de rotina. Assim como na revisão rápida, todos os esfregaços identificados como suspeitos e que não foram identificados pelo escrutínio de rotina são posteriormente submetidos a revisão detalhada por profissional experiente, que determinará o diagnóstico final[34,35]. Esse método é mais interessante do que a revisão rápida de 100% para os escrutinadores, porque a prevalência das anormalidades é maior pelo fato de todos os esfregaços serem submetidos a pré-avaliação, e permite ainda estimar a sensibilidade relativa do pré-escrutínio rápido e do escrutínio de rotina[34,35].

O pré-escrutínio rápido pode ser utilizado como método de controle interno da qualidade, bem como para avaliar o desempenho de toda a equipe, sendo mais eficiente na detecção de resultados falso-negativos quando comparado com o método de revisão de 10% e de critérios clínicos de risco[31,36].

Correlação entre os resultados citológicos e histológicos

Recomenda-se, sempre que possível, a correlação cito-histológica, apontada como um dos melhores indicadores de garantia da qualidade dos exames citológicos[12,37].

Um estudo mostrou a correlação de 157 esfregaços citopatológicos cérvico-vaginais com suas respectivas biopsias e observou uma concordância em 75,8% dos casos[38]. Todavia, os dados variaram amplamente em estudos semelhantes ou que envolviam outros observadores. A análise histológica, principalmente a citológica, tem forte componente de subjetividade que pode resultar em alta variabilidade diagnóstica intra e interobservador[38]. Algumas razões podem explicar as discordâncias ou discrepâncias cito-histológicas. Não é raro verificar lesões histológicas cujo grau é maior do que aquele observado no esfregaço citológico. Isso pode ocorrer quando o esfregaço apresenta uma lesão de baixo grau do epitélio escamoso, ao passo que uma lesão de alto grau pode estar localizada no segmento endocervical próximo a ela, não está representada ou está parcialmente representada no esfregaço[37]. Razões como essas podem explicar, em parte, um esfregaço classificado como negativo no exame citológico, apesar de a biopsia revelar NIC III[39].

A correlação cito-histológica tem valor quando as amostras para ambos os exames forem colhidas no mesmo momento, pois, caso contrário, poderão ocorrer diferenças no diagnóstico cito-histológico por conta da regressão ou progressão da lesão. Portanto, quanto maior for o intervalo entre as coletas, menor é o significado dessa análise. Deve-se destacar que esse método é aplicável somente aos casos submetidos a biopsia e, portanto, não tem utilidade para os esfregaços negativos no escrutínio de rotina[7].

Revisão retrospectiva dos exames prévios negativos dos últimos cinco anos

A revisão de todos os esfregaços prévios negativos, realizados nos últimos cinco anos, deve ser feita sempre que houver um diagnóstico de um novo caso que demonstre alterações celulares significativas, como lesões intraepiteliais de alto grau (NIC II, NIC III) ou lesões invasoras[12].

Não é raro constatar erros de escrutínio ou interpretação em lâminas arquivadas nos últimos anos; tais casos constituem um importante instrumento de aprendizado e controle de qualidade. É um exercício eficiente de educação continuada e permite entender melhor a causa de resultados citopatológicos incorretos, bem como planejar formas de melhorar o desempenho da equipe[24,37].

Atualmente, diferentes sistemas de controle de qualidade são avaliados com objetivos de diminuir os casos falso-negativos, por conta da fragilidade da reprodutibilidade diagnóstica e da necessidade de se padronizar, o mais fielmente possível, o significado das alterações citológicas[40,41].

Novas alternativas de controle de qualidade com métodos que privilegiam a leitura computadorizada das lâminas parecem ser uma opção objetiva para superar os obstáculos da observação subjetiva, que são ainda mais acentuados

978-85-4120-024-0

em lesões glandulares[41]. A leitura automatizada dos preparados citológicos exclui, com grande segurança, os casos verdadeiramente negativos. Os casos alterados são classificados em "quinteles", com maior probabilidade de lesão, e podem ser visualizados em estações computadorizadas que os levam diretamente aos pontos de interesse para análise. Como vantagem adicional, os leitores atuais já servem para análise de lâminas convencionais, embora, para estas, a homogeneidade e o padrão de coloração sejam variáveis imprescindíveis para o bom desempenho do aparelho[41].

Recentemente, lançou-se o plano de ação para a redução da incidência de mortalidade por câncer de colo do útero[42]. Todavia, em relação à avaliação de novas tecnologias, a discussão sobre a incorporação da vacina contra HPV no Brasil foi feita de forma integrada, considerando as duas vacinas atualmente disponíveis e aprovadas pela ANVISA ([quadrivalente-Gardasil/Merck & Co.®] e (bivalente-Cervarix/GlaxoSmithkline®)], com fim de prevenção primária para o câncer de colo de útero[43]. As evidências científicas relacionadas à vacinação contra HVP indicam que ainda existem lacunas de conhecimento relacionadas à duração de eficácia, à eventual necessidade de dose de reforço e à proteção cruzada. Ainda, a redução da prevalência de lesões intraepiteliais cervicais aponta para a necessidade de utilização de testes mais sensíveis e específicos para o rastreio de população vacinada, entre outras[42]. Diante desses indicadores, concluiu-se que a incorporação da vacina contra HPV na realidade atual não é factível, pois levaria à inviabilidade do equilíbrio no financiamento do SUS[42].

Quanto aos métodos diagnósticos empregados para o rastreamento, também foi apresentada uma revisão sobre eficácia e custo-efetividade. As evidências científicas disponíveis mostram que a citologia em meio líquido ou automatizada, além de mais cara, não apresenta melhor desempenho quando comparada com a técnica convencional[44]. Entretanto, a automação pode ser considerada uma alternativa para áreas carentes de profissionais especializados[45].

Fase pós-analítica

O objetivo dessa fase é a garantia da qualidade efetiva dos processos pós-analíticos, i. e., a transformação de resultados em laudos, a comunicação entre o citologista e o médico e a interpretação e o uso dos resultados pelos médicos. A nomenclatura utilizada deve garantir a unificação mundial do citodiagnóstico, que se preste a uma correlação com a histologia.

O laudo deve ser legível, sem rasuras, escrito em língua portuguesa, datado e assinado por profissional legalmente habilitado, e deve conter itens mínimos, segundo recomendações. No laudo, devem constar os exames realizados com amostras com restrições, p. ex., em esfregaços cervicais, avaliar a adequabilidade da amostra e verificar se há algum fator que possa estar prejudicando parcialmente a avaliação (p. ex., ausência de células endocervicais e/ou metaplásicas, material espesso, hemorrágico, má fixação etc.)[12]. Caso haja a necessidade de retificação em qualquer dado constante do laudo já emitido, esta deve ser feita em um novo laudo, em que fica clara a retificação realizada[1].

Os laudos das amostras ginecológicas devem ser referendados segundo o sistema de Bethesda, devendo as amostras não ginecológicas ser reportadas conforme o correspondente ao diagnóstico histopatológico[18]. No Brasil, o Ministério da Saúde, por intermédio do Instituto Nacional de Câncer, recomenda que os laudos sejam elaborados de acordo com a Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais[13]. Os resultados devem ser expressos em formulários padronizados nacionalmente para o Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e da Mama e no SISCOLO. Recomenda-se que, no máximo em 30 dias, a mulher possa ter em mãos o resultado do seu exame citopatológico[12].

Arquivo/registro

De acordo com as recomendações do Ministério da Saúde, as lâminas de citopatologia negativas ou positivas devem ser arquivadas por

978-85-4120-024-0

um período mínimo de cinco anos, levando-se em consideração[12]:

- A periodicidade para a repetição do exame citopatológico (Papanicolaou) a cada três anos, após dois exames anuais negativos.
- A revisão de quaisquer esfregaços negativos prévios, sempre que for feito o diagnóstico de um novo caso de lesão intraepitelial de alto grau (NIC II/NIC III) ou lesão invasora.

As cópias dos laudos de análise, bem como os dados brutos, devem ser arquivadas pelo prazo de cinco anos, facilmente recuperáveis, de forma a garantir seu rastreamento. Caso haja necessidade de retificação de qualquer dado constante do laudo já emitido, ela deverá ser feita em um novo laudo, em que fica clara a retificação realizada[1]. Após esse prazo, utilizar outros métodos de registro que assegurem a restauração plena das informações (p. ex., microfilmagem, arquivos informatizados). Arquivar os laudos informatizados em CD, guardando-os apropriadamente rotulados, armazenados e protegidos contra avarias e uso indevido[12].

O laboratório clínico deve garantir a recuperação e a disponibilidade de seus registros críticos, de modo a permitir o rastreamento do laudo liberado. As alterações efetuadas nos registros críticos devem conter data, nome ou assinatura legível do responsável pela alteração, preservando o dado original[1].

O laboratório tem toda a responsabilidade em arquivar as lâminas com seus respectivos laudos. No entanto, a paciente tem o direito de solicitar sua lâmina ao laboratório caso queira pedir outra opinião sobre o diagnóstico. Nesse caso, a paciente deverá fazer a solicitação da lâmina por escrito, solicitação essa que deverá ser assinada pela própria paciente. O laboratório deverá entregar a lâmina no prazo máximo de 48 h, mediante um documento (registro) que deverá ser assinado pela paciente ou solicitante declarando que recebeu a lâmina. Esse documento deverá ser arquivado para comprovação de empréstimo ou cessão de lâminas à paciente ou a outro laboratório, transferindo toda a responsabilidade pela guarda do material[12].

CONTROLE EXTERNO DA QUALIDADE

No intuito de avaliar o desempenho dos profissionais responsáveis pela análise dos exames citopatológicos, várias estratégias de controle interno da qualidade têm sido propostas, como descrito anteriormente. No entanto, a avaliação do desempenho dos laboratórios somente pode ser alcançada mediante o controle externo da qualidade[12,46].

O laboratório clínico deve participar de programa de controle externo da qualidade, i. e., de ensaios de proficiência para todos os exames realizados em sua rotina. Quando o programa de controle externo da qualidade não contemplar qualquer tipo de exame realizado na rotina, a avaliação interlaboratorial pode ser utilizada pelo laboratório como um método de controle externo de qualidade para essa modalidade de exame[1].

O responsável pelo controle externo da qualidade do laboratório deve registrar todos os resultados obtidos. Nos casos de discordâncias ou discrepâncias dos resultados, devem-se investigar as causas, definir as ações para corrigi-las e, caso necessário, implementar educação continuada[12].

Os laboratórios participantes do Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero devem, obrigatoriamente, encaminhar suas lâminas, selecionadas pelo SISCOLO, para a releitura nos laboratórios definidos pela coordenação estadual do programa como UMEQ. Estes deverão participar de ensaios de proficiência e do monitoramento externo da qualidade, conforme definido pela Portaria SPS/SAS nº 92/2001[4].

Em todos os estados, devem ser viabilizados laboratórios de referência para atuar nas atividades de monitoramento externo da qualidade – UMEQ –, seguindo as recomendações estabelecidas pelo Ministério da Saúde/Instituto Nacional do Câncer (MS/INCA). No entanto, o monitoramento externo da qualidade não foi amplamente implantado no País[12,42].

No SISCOLO, todos os exames para monitoramento externo serão selecionados automaticamente no momento da sua digitação. Para o

monitoramento externo, a amostra deve atingir o mínimo de 10% do total de exames realizados e obedecer aos seguintes critérios de seleção[12]:

- Todas as lâminas com casos positivos.
- Todas as lâminas insatisfatórias.
- Mínimo de 5% dos exames normais, selecionados pelo número final do exame, aleatoriamente.

A discordância diagnóstica obtida pelas UMEQ deverá ser avaliada caso a caso, buscando o consenso entre o laboratório de origem e a UMEQ. Serão considerados discordantes os casos em que haja mudança de conduta clínica[12].

Os exames discordantes serão imediatamente comunicados ao laboratório de origem, que poderá recorrer da opinião da UMEQ caso não venha a concordar com o parecer dos revisores. Entretanto, caso o laboratório de origem concorde com o parecer dos revisores, caberá a ele reemitir o laudo de revisão, mencionando que ela foi realizada em conjunto com a UMEQ de referência[12].

Os laudos discordantes, após reemitidos pelos laboratórios de origem, serão encaminhados às regionais ou às unidades de saúde, que deverão localizar as pacientes em questão e reprogramar o tratamento com base no parecer exclusivo do laudo atual de revisão. Para que não haja prejuízo para a paciente, é necessário que esse processo ocorra em tempo hábil para a reprogramação do tratamento[12].

Referências

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada. RDC nº 302. Dispõe sobre regulamento técnico para funcionamento de laboratórios clínicos, 2005. Disponível em: http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/320100416093919.pdf. Acesso em: 21 jul. 2010.
2. PALHANO, R. M. A. B.; JUNG, W. C.; AMARAL, R. G. **Lista de Verificação da Sociedade Brasileira de Citologia Clínica**. Goiânia: SBCC, 2001. Disponível em: http://www.citologiaclinica.org.br/arquivos/documentos/listaverificacao.pdf. Acesso em: 10 nov. 2010.
3. BONINI, P.; PLEBANI, M.; CERIOTTI, F. et al. Errors in laboratory medicine. **Clin. Chem.**, v. 48, p. 691-698, 2002.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde e Secretaria de Assistência à Saúde – Portaria Conjunta nº 92, de 16 de outubro de 2001. Dispõe sobre o controle da qualidade do exame citopatológico. Disponível em < http://sna.saude.gov.br/legisla/legisla/tab_sia/SPS_SAS_PC92_01tab_sia.doc> Acesso em: 10 de maio. 2011.
5. AMERICAN SOCIETY OF CYTOPATHOLOGY. **Cervical Cytology Practice Guideline**. Wilmington: ASC, 2000.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada. RDC nº 50, de 21 de fevereiro de 2002. Dispõe sobre o regulamento técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde, 2002. Acesso em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/ 2002/50_02rdc.pdf. Acesso em: 28 out. 2010.
7. TAVARES, S. B. N.; AMARAL, R. G.; MANRIQUE, E. J. C. et al. Controle de qualidade em citopatologia cervical: revisão de literatura. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 53, p. 355-364, 2007.
8. QUEIROZ, C.; LIMA, D. **O Laboratório de Citopatologia:** aspectos técnicos e operacionais. Salvador: EDUFPE, 2000.
9. GAY, J. D.; DONALDSON, L. D.; GOELLHER, J. R. False negative results in cervical citologic studies. **Acta Cytologica**, v. 29, p. 1043-1046, 1985.
10. KOSS, L. G. The papanicolau test for cervical cancer detection: a triumph and a tragedy. **The Journal of the American Medical Associational**, v. 261, p. 737-743, 1989.
11. MARTIN-HIRSCH, P.; JARVIS, G.; KITCHENER, H. et al. Dispositivos de recolección de muestras citológicas cervicales. **Cochrane Plus**, v. 2, p. 1-46, 2008.
12. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Manual de Gestão da Qualidade para Laboratórios de Citopatologia**. Rio de Janeiro: Inca, 2012. p. 190. Disponível em: http://www.inca.org.br/.pdf. Acesso em: 22 de maio de 2012.
13. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Condutas Preconizadas:** recomendações para profissionais de saúde. 2. ed., Rio de Janeiro: INCA, 2006. p. 56.
14. MCKEE, G. T. Esfregaços inadequados, inflamação e infecção. In: MCKEE, G. T. **Citopatologia**. Rio Grande do Sul: Artes Médicas, 1997. p. 35-50.
15. TAKAHASHI, M. **Atlas en Color de Citología del Cáncer**. Barcelona: Científico Médica, 1973.
16. DIGENE. **Sistema DNA-citoliq:** a citologia em nova era: coleta de amostras. São Paulo: DIGENE, 2002.
17. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada. RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde, 2004. Disponível em: http://pegasus.fmrp.usp.br/projeto/legislacao/RDC%20306%20de%2007%2012%2004.pdf. Acesso em: 11 maio 2011.
18. SOLOMON, D.; NAYAR, R. **Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal**. 2. ed., Rio de Janeiro: Revinter, 2005.
19. CDC – Center for Disease Control. **Regulations for Implementing the Clincal Laboratory Improvement Amendments of 1988:** a summary. MMWR. 1992. p. 17.

20. WIENER, H. G. et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for cytology laboratories. **Cytopathology**, v. 18, p. 67-78, 2007.
21. MILLER, A. B.; NAZEER, S.; FONN, S. et al. Report on consensus conference on cervical cancer screening and management. **Int. J. Cancer**, v. 86, p. 440-447, 2000.
22. MODY, D. R.; DAVEY, D. D.; BRANCA, M. et al. Quality assurance and risk reduction guidelines. **Acta Cytol.**, v. 44, p. 496-507, 2000.
23. JONES, B. A.; DAVEY, D. D. Quality management in gynecologic cytology using interlaboratory comparison. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 124, n. 5, p. 672-681, 2000.
24. PITTOLI, J. E.; MELLO, E. S.; PEREIRA, S. M. M. et al. Revisão de esfregaços negativos em pacientes com lesões intra-epiteliais de alto grau. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, p. 219-221, 2003.
25. PAJTLER, M.; AUDY-JURKOVIC, S.; SKOPLJANAC-MACINA, L. et al. Rapid cervicovaginal smear screening: method of quality control and assessing individual cytotecnologist performance. **Cytopathology**. v. 17, p. 121-126, 2006.
26. VECCHIONE, A.; CENCI, M. The false negative smears: facts andsolutions. In: TESTA, R.; JAKOB, C. A.; HUGUET, J. O (Eds.). **Proceedings of the X World Congress of Cervical Pathology & Colposcopy**, 1999 Nov. 7-11, Buenos Aires, Argentina. Bologna: Italy, 1999. p. 53-57.
27. MANRIQUE, E. J. C.; AMARAL, R. G.; SOUZA, N. L. A. et al. Evaluation of 100% rescreening of negative cervical smears as a quality assurance measure. **Cytopathology**, v. 17, p. 116-120, 2006.
28. MANRIQUE, E. J. C.; SOUZA, N. L. A.; TAVARES, S. B. N. et al. Analysis of the performance of 100% rapid review using an average time of 1 and 2 minutes according to the quality of cervical cytology specimens. **Cytopathology**, v. 22, p. 195-201, 2011.
29. DUDDING, N.; HEWER, E. M.; LANCUCKI, L. et al. Rapid screening: a comparative study. **Cytopathol.**, v. 12, p. 235-248, 2001.
30. AMARAL, R. G.; ZEFERINO, L. C.; HARDY, E. et al. Quality assurance of cervical smears: 100% rapid rescreening versus 10% random rescreening. **Acta Cytol.**, v. 49, p. 244-248, 2005.
31. TAVARES, S. B.; ALVES DE SOUSA, N. L.; MANRIQUE, E. J. et al. Comparison of the performance of rapid prescreening, 10% random review, and clinical risk criteria as methods of internal quality control in cervical cytopathology. **Cancer**, v. 114, p. 165-170, 2008.
32. KAMINSKY, F. C.; BURKE, R. J.; HABERLE, K. R. et al. An economic model for comparing alternative policies for cervical cytologic smear screening. **Acta Cytol.**, v. 39, p. 232-238, 1995.
33. HUTCHINSON, M. L. Assessing the costs and benefits of alternative rescreening strategies [Editorial]. **Acta Cytol.**, v. 40, p. 4-8, 1996.
34. SMITH, J.; NICHOLAS, D.; BOYD, K. et al. Rapid prescreening: a validated quality assurance measure in cervical cytology. **Cytopathology**, v. 14, p. 275-280, 2003.
35. DJEMLI, A.; KHETANI, K.; AUGER, M. Rapid prescreening of Papanicolaou smears. **Cancer Cytopathol.**, v. 108, p. 21-26, 2005.
36. BROOKE, D.; DUDDING, N.; SUTTON, J. Rapid (partial) prescreening of cervical smears: the quality control method of choice? **Cytopathology**, v. 13, p. 191-199, 2002.
37. KOSS, L. G.; GOMPEL, C. **Introdução à Citopatologia Ginecológica com Correlações Histológicas e Clínicas**. 1. ed., São Paulo: Roca, 2006. p. 203.
38. DI LORETO, C.; MAEDA, M. Y. S.; UTAGAWA, M. L. et al. Garantia de qualidade em citopatologia: aspectos da correlação cito-histopatológica. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 43, p. 195-198, 1997.
39. AL-NAFUSSI, A. I.; COLQUHOUN, M. K. Mild cervical intraepithelial neoplasia (CIN 1): a histological over diagnosis. **Histopathology**, v. 17, p. 557-561, 1990.
40. ALDERISIO, M.; BRANCA, M.; ERZEN, M. et al. Interlaboratory quality control in gynecologic cytopathology using the novel CONQUISTADOR software. Interobserver reproducibility in the Latin American screening study. **Acta Cytol.**, v. 51, n. 6, p. 872-881, 2007.
41. WILBUR, D. C.; BLACK-SCHAFFER, W. S.; LUFF, R. D. et al. The Becton Dickinson Focal Point GS Imaging System: clinical trials demonstrate significantly improved sensitivity for the detection of important cervical lesions. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 132, n. 5, p. 767-775, 2009.
42. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Plano de Ação para Redução da Incidência e Mortalidade por Câncer de Colo do Útero**. Sumário Executivo. Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e da Mama. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: http://inca.gov.br. Acesso em: 11 maio 2011.
43. BRASIL. Ministério da Saúde. **Parecer sobre a Vacina contra HPV. Relatório do Grupo de Trabalho para Avaliação da Incorporação da Vacina contra HPV, Instituído pela Portaria 3124 de 7 de dezembro de 2006**. Brasília, INCA, SAS, SVS, SCTIE, abril de 2007.
44. ARBYN, M.; HERBERT, A.; SCHENCK, U. et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for collecting samples for conventional and liquid-based cytology. **Cytopathology**, v. 18, p. 133-139, 2007.
45. NIEMINEN, P. et al. Randomized evaluation trial on automation-assisted screening for cervical cancer – results after 777,000 invitations. **J. Med. Screen**, v. 14, n. 1, p. 23-28, 2007.
46. BRANCA, M. et al. Members of the working group for external quality control in cervical cytopathology. Reliability and accuracy in reporting CIN in 14 laboratories: developing new indices of diagnostic variability in an interlaboratory study. **Acta Cytol.**, v.42, p. 1370-1376, 1998.
47. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Diretrizes brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero**. Rio de Janeiro, 2011. p. 104.

Capítulo **14**

Vacinas contra o Papilomavírus Humano

Lara Termini
Enrique Boccardo

DESENVOLVIMENTO DE VACINAS PROFILÁTICAS CONTRA O HPV

O câncer cervical e outras doenças induzidas pelo HPV são um problema de saúde pública global. Assim, a OMS recomenda que a vacinação contra o HPV seja incluída nos programas nacionais de vacinação[1]. A prevenção primária para o controle do câncer do colo do útero baseia-se na utilização de vacinas profiláticas, ou seja, que impeçam a infecção pelo HPV. A utilização desse tipo de vacina promove a indução de respostas imunes potentes e específicas contra os principais tipos de HPV causadores de tumor. Atualmente, existem duas versões dessas vacinas disponíveis no mercado. Uma delas protege contra os HPV 16, 18, 6 e 11, sendo conhecida como vacina quadrivalente (Gardasil®, Merck & Co.). A outra, conhecida como bivalente, confere imunidade para os vírus 16 e 18 (Cervarix®, GlaxoSmithkline) (Tabela 14.1).

Ambas são administradas por via intramuscular em três doses (0, 1 ou 2 e 6 meses). Foram realizados diversos ensaios clínicos dessas duas vacinas profiláticas em diferentes países, em aproximadamente 50.000 indivíduos, incluindo mulheres de 16 a mais de 55 anos de idade[2-5]. Diversos estudos realizados até o momento demonstraram que as duas vacinas são seguras em seres humanos. Os efeitos adversos mais comuns foram reações como dor, edema e eritema. Poucas reações adversas graves, como broncospasmo, cefaleia intensa, hipertensão e gastrenterite, foram observadas em cerca de

0,5% dos indivíduos. A grande maioria das reações mencionadas anteriormente foi leve ou moderada e de curta duração[6,7].

Ambas as vacinas são compostas de VLP (*virus-like particles*) e não possuem o vírus vivo/atenuado ou o material genético viral. As VLP são partículas similares ao capsídio do vírus, formadas apenas por várias moléculas combinadas da proteína principal do capsídio viral, denominada L1. As vacinas profiláticas de VLP de HPV conferem proteção mediante a indução de anticorpos neutralizantes contra os tipos de HPV presentes nas vacinas. Sete a dez dias após a vacinação, aproximadamente, ocorre a produção de altos níveis de anticorpos contra as VLP. Contrariamente do que é observado nas infecções naturais por HPV, em que apenas metade dos indivíduos produz anticorpos contra os vírus, após a vacinação, praticamente todos os indivíduos apresentam altos níveis de anticorpos. Ainda mais importante, as respostas imunes disparadas por ambas as vacinas são muito elevadas, observando-se títulos de anticorpos mais de uma centena de vezes superiores àqueles verificados em mulheres da mesma faixa etária, naturalmente expostas aos diferentes HPV em estudo. Dentre outras causas, esse efeito pode ser explicado pela quantidade de VLP que entram em contato com o sistema imune. Contudo, os títulos mínimos de anticorpos capazes de induzir imunidade protetora não são conhecidos[2]. Dessa forma, tornou-se de extrema importância analisar os resultados de eficácia das vacinas não apenas em base aos títulos de anticorpos, mas analisando dados clínicos definidos, como aparecimento de lesões cervicais, vulvares, vaginais e/ou verrugas[2]. Após o primeiro pico de anticorpos, os títulos produzidos pelas vacinas bi e quadrivalente estabilizam-se a partir do 18º e do 24º mês, respectivamente, e se mantêm estáveis por vários anos[4,5]. Estima-se que essas vacinas baseadas em VLP possam induzir imunidade profilática prolongada por disparar memória imunológica, conforme demonstrado em diversos estudos[8,9]. Apesar da eficácia comprovada, ainda é incerto se há a necessidade de reforço vacinal após a terceira dose.

Ensaios clínicos das vacinas profiláticas contra HPV 16 estão em andamento desde 1997. Até o momento, as duas vacinas mostraram-se eficientes contra a infecção pelo HPV nas mulheres que, no momento da vacinação, não haviam sido infectadas pelo vírus. A eficácia da vacina é de aproximadamente 100% para a prevenção de lesões intraepiteliais cervicais. No caso da vacina quadrivalente, para condilomas e lesões intraepiteliais vulvares e vaginais[2].

Um fato importante que deve ser levado em consideração é que as vacinas profiláticas disponíveis não conferem proteção contra o aparecimento de lesões decorrentes de infecções preexistentes por algum dos tipos virais incluídos

Tabela 14.1 – Características das vacinas quadrivalente e bivalente

	Vacina quadrivalente	Vacina bivalente
Nome comercial (Brasil)	Gardasil®	Cervarix®
Produtor	Merck & Co.	GlaxoSmithkline (GSK)
Liberação pela FDA[16]	Junho de 2006	Outubro de 2009
Liberação pela ANVISA	Agosto de 2006	Fevereiro de 2008
Via de administração	Intramuscular (0,5 mℓ)	Intramuscular (0,5 mℓ)
Imunidade específica	HPV 6, 11, 16 e 18	HPV 16 e 18
Imunidade cruzada	HPV 31, 33, 52, 56, 58 e 59	HPV 31, 45 e 52
Esquema de doses	3 doses (0, 2, 6 meses)	3 doses (0, 1, 6 meses)
Faixa etária indicada no Brasil	9 a 26 anos	10 a 25 anos

Adaptada de Fregnani e Villa[17].

978-85-4120-024-0

nas vacinas. Ainda mais, essas vacinas não são eficazes para o tratamento de infecções nem de lesões induzidas por HPV. Sua utilização tem apenas como objetivo prevenir a infecção inicial por HPV[2]. A Tabela 14.2 mostra as indicações de uso das vacinas quadrivalente e bivalente de acordo com as recomendações da FDA dos EUA[6].

Interessantemente, verificou-se, em diversos estudos, a existência de proteção cruzada. Ou seja, apesar de as vacinas conterem apenas VLP específicas de determinados tipos virais, ocorreu proteção contra infecção por outros tipos não presentes nas vacinas descritas[2,10]. Há muito interesse em verificar a possibilidade de proteção cruzada, dada a similaridade genética entre diversos tipos de HPV. Os ensaios clínicos em andamento poderão fornecer tais informações ainda não claramente estabelecidas. Em relação à vacina bivalente, os estudos demonstraram a existência de proteção cruzada contra os HPV de alto risco 31, 45 e 52. As respectivas taxas de eficácia da vacina em prevenir infecções persistentes por esses tipos virais foram de 36,1%, 59,9% e 31,6%[5]. Apesar do interesse extremo nesses resultados, ainda não há informação suficiente sobre a efetividade e a durabilidade das respostas imunes geradas contra outros tipos de HPV não incluídos nas vacinas. Até o momento, estudos com a vacina quadrivalente apontaram a redução de aproximadamente 20% no risco de desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais (NIC I, II e III) e de adenocarcinoma *in situ* induzidos pelos HPV de alto risco 31, 33, 52, 56, 58 e 59. Entretanto, não há evidências suficientes para se concluir que essa vacina confira proteção cruzada para o HPV 45[4,11].

Até o presente momento, não foi registrado qualquer caso de doença em mulheres vacinadas e seguidas nos estudos. Contudo, ainda não se sabe por quanto tempo essas vacinas conferirão proteção contra a infecção por HPV. Além disso, não são conhecidos os títulos mínimos de anticorpos induzidos pelas vacinas capazes de conferir proteção. Apenas com o seguimento dos estudos se saberá por quanto tempo essas vacinas conferirão efeito protetor[8,12]. Atualmente, tem-se verificado clara redução na infecção por HPV na população vacinada. Consequentemente, espera-se a diminuição na incidência das lesões precursoras cervicais e no número de casos de câncer do colo do útero. Um estudo interessante mostra redução de quase 50% no risco de novos casos de verrugas genitais nas mulheres australianas sexualmente ativas participantes de um programa de imunização do país[13].

Apesar de as vacinas conferirem imunidade contra os HPV mais prevalentes associados ao câncer do colo do útero, há a possibilidade de infecção por outros tipos de HPV de alto risco não incluídos nas vacinas. Por esse motivo, ainda se faz necessária a prevenção secundária do câncer do colo do útero mediante citologia cervical. A mulher vacinada deverá ser esclarecida a esse respeito e orientada a fazer periodicamente visitas ao ginecologista, além de realizar exames de citologia cervical[14].

Tabela 14.2 – Indicações para o uso das vacinas quadrivalente e bivalente de acordo com a FDA[6]

Critério de indicação	Vacina quadrivalente	Vacina bivalente
Idade	9 - 26 anos	10 - 25 anos
Gênero	Mulheres e homens*	Mulheres
Prevenção de condiloma acuminado	Sim	Não
Prevenção do câncer do colo do útero	Sim	Sim
Prevenção do câncer de vulva	Sim	Não
Prevenção do câncer de vagina	Sim	Não
Prevenção do adenocarcinoma *in situ* do colo	Sim	Sim
Prevenção da NIC - graus I, II e III	Sim	Sim
Prevenção da NIV - graus II e III	Sim	Não
Prevenção da NIVA - graus II e III	Sim	Não

Adaptada de Fregnani e Villa[17].
* Até o momento, para os homens, a única indicação do uso da vacina é para a prevenção de condiloma acuminado.

UTILIZAÇÃO DAS VACINAS NO BRASIL E NO MUNDO

As vacinas quadrivalente e bivalente estão aprovadas para uso em mais de uma centena de países[15]. Até o presente momento, foram administradas mais de 25 milhões de doses da vacina quadrivalente apenas nos EUA. Com base nos resultados dos ensaios clínicos realizados, a FDA aprovou o uso da vacina quadrivalente em 2006, nos EUA, para mulheres com idades entre 9 e 26 anos. Nos homens entre 9 e 26 anos, a FDA autorizou o uso da vacina em 2009. Os laboratórios que produzem as vacinas, baseados em diversos estudos mundiais, sugerem a extensão da vacinação para as mulheres com idades entre 27 e 45 anos, uma vez que essas mulheres são sexualmente ativas e podem vir a ter novos parceiros[16]. No Brasil, o Ministério da Saúde aprovou o uso, em mulheres, tanto da vacina quadrivalente quanto da bivalente em 2006 e 2008, respectivamente. Apesar de essas vacinas já terem sido liberadas no País, nenhuma delas ainda foi incluída oficialmente no Programa Nacional de Imunização até o presente momento. Ambas as vacinas estão disponíveis somente na rede privada, a um custo elevado. A Sociedade Brasileira de Pediatria (2008) recomenda o uso da vacina quadrivalente para as mulheres com idades entre 9 e 26 anos. A Sociedade Brasileira de Imunizações sugere o uso de qualquer uma das vacinas a partir dos 9 anos de idade até os 26 (vacina quadrivalente) ou 25 anos (vacina bivalente)[17].

ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS CONTRA TUMORES CAUSADOS POR HPV

As vacinas profiláticas contra o HPV são uma das primeiras vacinas desenvolvidas para prevenir um câncer humano. Essas vacinas são muito eficientes para inibir a infecção inicial por HPV e apresentam, portanto, um grande potencial para diminuir o número de tumores associados a esse vírus. No entanto, essas vacinas não possuem efeito terapêutico para infecções já estabelecidas. Além disso, é provável que elas não estejam disponíveis a curto prazo para populações de países em desenvolvimento por conta de restrições econômicas. Portanto, é necessário o desenvolvimento de estratégias alternativas para prevenir o câncer em indivíduos portadores de lesões precursoras associadas ao HPV e para o tratamento de tumores já estabelecidos.

As lesões pré-malignas e malignas associadas à infecção por HPV de alto risco oncogênico constituem excelentes modelos para desenhar estratégias imunoterapêuticas contra o câncer. As células epiteliais presentes nessas lesões expressam continuamente as oncoproteínas virais E6 e E7, uma vez que estas são necessárias para a transformação celular e a manutenção do fenótipo tumoral da célula. Portanto, na teoria, deveria ser mais simples desenvolver estratégias imunoterapêuticas para doenças associadas ao HPV do que para tumores que expressam proteínas celulares modificadas como antígenos tumorais específicos. Entretanto, até pouco tempo atrás, as diferentes estratégias utilizadas, mesmo apresentando resultados favoráveis em animais de laboratório, fracassaram na hora de produzir resultados de relevância clínica. Recentemente, um estudo realizado utilizando peptídeos longos de E6 e E7 com adjuvante resultou no aumento na taxa de regressão, e a eliminação de NIV incentivou novas pesquisas no assunto[18].

BASE CONCEITUAL DA IMUNOTERAPIA CONTRA HPV

Os tumores associados ao HPV apresentam uma série de características que os tornam modelos excelentes para estudos de imunoterapia contra o câncer. Uma característica fundamental é que esses tumores expressam, de maneira contínua, dois antígenos virais bem conhecidos que podem representar alvos fundamentais no desenvolvimento de terapias[19].

As lesões precursoras de tumores associados ao HPV são consequência da infecção persistente

por alguns tipos virais. Portanto, a implementação de imunoterapias efetivas exige o entendimento dos mecanismos imunológicos que possibilitam ou inibem tal tipo de infecção, assim como das estratégias virais de evasão. Os mecanismos de resposta imune contra as infecções por HPV são apresentados em detalhes em outro capítulo deste livro e, portanto, não serão discutidos em profundidade aqui. No entanto, é fundamental lembrar que a resposta imune mediada por células é, em princípio, mais importante que a resposta humoral na eliminação de infecções por esse vírus. A existência de grupos de indivíduos infectados e não infectados saudáveis, associada ao fato de que tumores associados ao HPV são mais frequentes em indivíduos imunossuprimidos, mostra o papel fundamental das células T nesse tipo de tumor[18].

Estudos que compararam grupos de pacientes infectados por HPV e com diferente evolução clínica mostraram que a persistência viral está associada à ausência de uma resposta mensurável de células T específicas para HPV. Geralmente, pacientes com lesões de alto grau induzidas por HPV 16 não apresentam resposta sistêmica ao vírus. De fato, quando presentes, as células T específicas para HPV detectadas nesses casos são inativas ou até supressoras. Por outro lado, a detecção de resposta sistêmica específica para HPV 18, associada à maior produção de IFNγ, está correlacionada com maior número de células T infiltrantes e melhor prognóstico em pacientes com lesões de alto grau. Mais ainda, a presença de linfócitos infiltrantes de tumor específicos para HPV é associada a maior taxa de sobrevida livre de doença após radioterapia. Por outro lado, a resposta de tipo Th2 específica para HPV é associada ao encurtamento da sobrevida livre de doença nesse grupo de pacientes[18].

A transição entre epitélio normal, displasia leve, displasia grave até carcinoma está associada à instalação de um microambiente imunossupressor. Observa-se redução local nos níveis de IFNγ, aumento de IL-10 e infiltração por linfócitos CD4 e CD8 ativados que não produzem granzima B e que expressam PD-1 como sinal de exaustão. Existe, também, aumento no número de células T reguladoras (FOXp3+), células IDO+ e macrófagos com fenótipo M2, todos associados à supressão da resposta imunológica específica contra o tumor[18,20].

Estudos clínicos mostram que as lesões que regridem de forma espontânea estão infiltradas por linfócitos CD8 citotóxicos que expressam granzima B e/ou poucos macrófagos e alta relação de linfócitos CD4 e CD8 sobre células T reguladoras (Tregs). De fato, a relação entre linfócitos CD8 e Tregs é um fator prognóstico independente no carcinoma cervical.

Essas observações mostram que os tumores associados ao HPV apresentam mecanismos de evasão semelhantes aos detectados em outros tipos tumorais. Além disso, sugerem que a produção de um perfil de citocinas de tipo Th1, por parte das células CD4 e CD8 específicas para E6 e E7, pode ter impacto positivo sobre a evolução da doença. Portanto, os protocolos de imunoterapia devem visar à reativação específica desses tipos celulares em paralelo com a regulação apropriada da atividade de Tregs, macrófagos associados ao tumor e do microambiente tumoral.

ESTRATÉGIAS PARA DESENVOLVIMENTO DE VACINAS TERAPÊUTICAS CONTRA HPV

Entre os principais obstáculos para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas eficazes, podem-se citar os diferentes mecanismos de evasão e tolerância imunológica apresentadas pelo HPV, assim como o ambiente imunossupressor, característicos das lesões pré-malignas e tumores associados à infecção pelo vírus. Os mecanismos de evasão viral são variados e estão presentes desde a infecção inicial até o desenvolvimento de tumores. Eles incluem uma combinação de fatores como o efeito direto de algumas proteínas virais na inibição de diferentes componentes da maquinaria de apresentação antigênica, na inibição

de respostas antivirais celulares mediadas por interferon e receptores de tipo Toll e na indução de resistência a citocinas. Além disso, o fato de o vírus replicar nas camadas de células mais diferenciadas (superiores) dos epitélios e apresentar baixa expressão proteica e replicação viral nas camadas menos diferenciadas (inferiores e mais próximas da derme) restringe a exposição de antígenos virais a componentes do sistema imunológico. Finalmente, diferentes estudos mostraram que as células tumorais produzem e secretam várias citocinas capazes de recrutar leucócitos e induzir sua diferenciação em células supressoras.

Uma vacina eficaz contra o câncer deveria ser capaz de induzir uma resposta citotóxica específica para o tumor, bem como promover a infiltração do tumor por células efetoras e a redução do volume tumoral ou sua eliminação. Várias estratégias, com diferentes graus de sucesso, têm sido utilizadas para atingir esses objetivos, tendo como alvo principal o HPV 16, responsável por mais de 50% dos cânceres de colo de útero no mundo todo. Até o momento, as diferentes vacinas testadas em ensaios clínicos baseiam-se em proteínas de fusão, em peptídeos curtos ou longos derivados das oncoproteínas virais, em DNA ou no uso de células dendríticas e de vetores virais. Nesses casos, o uso de adjuvantes e imunomoduladores, assim como o modo de apresentação do(s) antígeno(s) viral(ais), constitui parâmetros fundamentais.

Vacinas baseadas em proteínas virais e peptídeos

Vacinas baseadas na utilização de peptídeos curtos possuem a vantagem de serem simples e de fácil produção. Estudos realizados com peptídeos curtos da proteína E7 de HPV 16 ($E7^{12\text{-}20}$ ou $E7^{86\text{-}93}$) ligados ao peptídeo não específico pan-HLA DR PADRE, que possui um epitopo para células T, obtiveram resultados que variaram da ausência de resposta clínica à remissão parcial ou total em mais da metade dos pacientes. Em resumo, esses trabalhos mostraram que a vacinação com peptídeos é bem tolerada, mas que as respostas imunes induzidas não foram suficientes para gerar resultados clínicos satisfatórios[21].

Outra estratégia adotada foi a utilização de vacinas baseadas em proteínas de HPV 16 fundidas entre si (L1/E7; L2/E7; L2/E6/E7; E6/E7) ou em fusão com proteínas bacterianas (E7 e HSP-65 de *Mycobacterium bovis BCG*; E7 e proteína D de *Haemophilus influenzae* [PD-E7]). Uma vantagem desse tipo de vacinas é que apresentam vários epitopos para linfócitos T citotóxicos (CTL) e, portanto, não é necessário determinar o haplótipo de HLA. Outra vantagem é que as proteínas *heat shock* de bactérias (HSP) induzem respostas imunes fortes em mamíferos, ativando simultaneamente respostas inatas e adaptativas. Isso favorece a maturação e a migração das células apresentadoras de antígenos, além de induzir a produção de moléculas coestimuladores e a secreção de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, os resultados clínicos obtidos até o momento com esse tipo de vacinas são limitados[20,22].

Resultados mais promissores foram obtidos com vacinas compostas de peptídeos sintéticos longos de E6/E7 de HPV 16. Esses peptídeos de 25 a 35 aminoácidos sobrepõem-se parcialmente, cobrindo a sequência completa das proteínas E6 e E7. Quando testados em um pequeno grupo de pacientes com câncer da cérvice uterina, induziram uma expansão robusta de células T CD4 e CD8 específicas contra as proteínas virais com produção de IFNγ. Além disso, um estudo clínico de fase II não controlado por placebo, realizado em mulheres com neoplasia intraepitelial de vulva (NIV) de alto grau positivas para HPV 16, mostrou que essa vacina é capaz de induzir resposta forte contra HPV 16 e gerar clara resposta clínica[18,20].

Vacinas baseadas em células dendríticas

As células dendríticas são as células apresentadoras de antígeno mais eficientes, também chamadas de células apresentadoras de antígeno

profissionais. Quando essas células são devidamente ativadas, são capazes de induzir uma forte resposta de células T efetoras e memória. Essas propriedades são exploradas por alguns pesquisadores para tratar pacientes com câncer da cérvice uterina avançado, utilizando células dendríticas autólogas e imaturas carregadas com o peptídeo E7[12-20]. Esse tratamento induziu respostas citotóxicas específicas e secreção de IFNγ em células mononucleares de sangue periférico em 6 das 15 pacientes estudadas. Além disso, nas pacientes que apresentaram resposta à vacina, verificou-se aumento do tempo de sobrevida e de vida livre de doença, quando comparadas àquelas tratadas com placebo[20,23].

Outros tipos de vacinas terapêuticas contra HPV

Vacinas de DNA contra HPV também têm sido desenvolvidas. A vacinação de animais de laboratório com uma vacina de DNA composta de versões truncadas dos genes L1 e E7 de HPV16 gerou a produção de anticorpos específicos contra L1 e desencadeou respostas de linfócitos citotóxicos específicas para L1 e E7. Tem-se testado, em ensaios clínicos em humanos, outra vacina baseada no uso de plasmídios de DNA que codificam fragmentos dos genes E6 e E7 de HPV 16 ou HPV 18 encapsulados em pequenas partículas biodegradáveis. Essa vacina foi utilizada para imunizar mulheres jovens (13 a 25 anos) diagnosticadas com NIC de alto grau. Testes de fases II e III para essa vacina estão em andamento[20,23].

Outras estratégias que vêm sendo consideradas incluem a aplicação de DNA e RNA virais, a utilização de sistemas baseados em vetores e a aplicação intranasal de cepas bacterianas que expressem proteínas de HPV. Essas abordagens apresentam uma série de vantagens quando comparadas às vacinas tradicionais baseadas em peptídeos e proteínas. Entre elas, destacam-se a indução de respostas Th1 e citotóxicas mais fortes e o aumento do tempo de exposição ao antígeno.

As vacinas baseadas em vetores podem ser divididas em duas categorias: (1) as que utilizam vetores bacterianos e (2) as que utilizam vetores virais. A grande vantagem em utilizar esse tipo de vacinas é que os vetores empregados possuem alta eficiência para transportar antígenos ou DNA que codifique para antígenos de interesse. Além disso, alguns desses vetores podem replicar e disseminar-se pelo organismo, potencializando assim a resposta imunológica. Outra vantagem apresentada por esse tipo de vacina é que existe uma ampla variedade de vetores para escolha. Por outro lado, esse tipo de vacinas pode apresentar uma série de desvantagens para sua aplicação clínica. De fato, alguns vetores podem apresentar riscos para o hospedeiro. Ainda mais, a aplicação dessas vacinas pode disparar a produção de anticorpos neutralizantes que podem limitar a eficácia de imunizações repetidas utilizando o mesmo vetor. Entre as bactérias testadas em vacinas terapêuticas contra doenças associadas ao HPV, estão incluídas *Listeria monocytogenes*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei*. Na maioria dos casos, o antígeno viral utilizado foi a proteína E7 de HPV 16, podendo ou não estar fusionada a alguma proteína bacteriana. Por exemplo, foi descrito recentemente o primeiro ensaio clínico de uma vacina terapêutica utilizando *Listeria* e que tem como antígeno a proteína E7 de HPV 16 fusionada a um fragmento de listeriolisina O[22,23].

Vírus recombinantes representam alvos atraentes para a vacinação terapêutica contra HPV. Esses vetores apresentam alta eficiência de infecção, uma vez que expressam altos níveis dos antígenos de interesse na célula infectada. Os vetores virais utilizados no desenvolvimento dessas vacinas incluem adenovírus, vírus adeno-associado, vírus *fowlpox*, vírus vaccinia, vírus da estomatite vesicular e alguns alfavírus, por exemplo, o vírus Semliki Forest, o vírus da encefalite equina venezuelana e o vírus Sindbis. Vale a pena ressaltar que a maioria dos testes desse tipo de vacinas é realizada em animais de laboratório. No entanto, ensaios clínicos de fases I/II utilizando vírus vaccinia recombinante que expressa as

proteínas E6/E7 de HPV 16 e 18 fusionadas estão em andamento para testar a eficácia dessa vacina em tumores cervicais de estágio Ib ou IIa, neoplasias intraepiteliais de vulva e vagina[22].

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Considera-se que uma vacina de alta eficácia contra HPV poderia ter, a médio e a longo prazo, impacto real e expressivo nas taxas de câncer do colo do útero (e de lesões pré-malignas), que, no Brasil, continuam com índices muito elevados. Por ser uma infecção de transmissão sexual, as vacinas profiláticas devem idealmente ser administradas em idade anterior à primeira relação sexual. Isso implicaria vacinar crianças/adolescentes de ambos os sexos. Entretanto, a faixa etária ideal para vacinação depende de uma série de fatores, incluindo o tempo de proteção (duração da resposta imune), que ainda estão sendo avaliados por ensaios clínicos em andamento. A expectativa para as próximas décadas, no entanto, é que a prevenção do câncer do colo do útero deverá continuar sendo baseada no rastreamento periódico da população mediante o teste de Papanicolaou, isoladamente ou em conjunto com testes de detecção molecular de HPV, o agente etiológico desses tumores.

O desenvolvimento de vacinas profiláticas eficientes contra os tipos de HPV mais prevalentes em tumores da cérvice uterina constitui uma vitória na luta contra o câncer. Além disso, espera-se que essas vacinas sejam eficientes na prevenção de outros tumores associados a esses vírus, por exemplo, os tumores de ânus, vagina, vulva, pênis, cabeça, pescoço etc. No entanto, é provável que devam transcorrer décadas até que essas vacinas estejam disponíveis para as populações de países em desenvolvimento e para que o impacto delas na incidência desses tumores seja perceptível. Portanto, é importante o desenvolvimento constante de vacinas terapêuticas eficientes e seguras para acelerar o controle dos tumores associados ao HPV. Conforme sugerido pelos dados de testes pré-clínicos de vacinas terapêuticas contra o HPV, o controle do câncer da cérvice uterina, e de outros tumores associados a esse vírus, exigirá a combinação da vacinação terapêutica com outras modalidades de tratamento. O descobrimento de novas drogas, o melhor entendimento dos mecanismos de progressão e a evasão imunológica dos tumores associados ao HPV permitirão a combinação eficiente de diferentes modalidades terapêuticas no tratamento dos tumores associados ao vírus.

Referências

1. WHO. Human papillomavirus vaccines. WHO position paper. **Weekly Epidemiological Record**, v. 15, p. 118-131, 2009.
2. WHO. **Human Papillomavirus and HPV Vaccines:** technical information for policy-makers and health professionals. Geneve: WHO Press, 2007.
3. SASLOW, D.; CASTLE, P. E.; COX, J. T. et al. American Cancer Society Guideline for human papillomavirus (HPV) vaccine use to prevent cervical cancer and its precursors. **CA Cancer J. Clin.**, v. 57, n. 1, p. 7-28, 2007.
4. GARDASIL Product information: Merck & CO; 2009 [updated 2009 6/01/2009; cited 2009 23/02/2009]; Available from: http://secure.healthlinks.net.au/content/csl/pi.cfm?product=cspgarda20308.
5. CERVARIX Product information. Boronia: GlaxoSmithKline Australia 2007 [updated 2007 16/05/2007; cited 2009 23/02/2009]; Available from: http://www.gsk.com.au/resources.ashx/vaccineproductschilddataproinfo/94/FileName/7A14FBAEA16635A2DD7A68ED78E8FDDC/PI_Cervarix.pdf.
6. FDA. Product approval information. US Food and Drug Administration; 2008 [updated 2008; cited 2008 05/07/2008]; Available from: http://www.fda.gov/cber/products/gardasil.htm.
7. CDC. Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Safety. Center for Disease Control and Prevention; 2009 [updated 2009; cited 2009 20/11/2009]; Available from: http://www.cdc.gov/vaccinesafety/Vaccines/HPV/Index.html.
8. VILLA, L. L.; COSTA, R. L.; PETTA, C. A. et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. **Br. J. Cancer**, v. 95, n. 11, p. 1459-1466, 2006.
9. CUTTS, F. T.; FRANCESCHI, S.; GOLDIE, S. et al. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. **Bull World Health Organ**, v. 85, n. 9, p. 719-726, 2007.
10. SCHILLER, J. T.; CASTELLSAGUE, X.; VILLA, L. L. et al. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. **Vaccine**, v. 26, Suppl. 10, p. K53-K61, 2008.
11. VILLA, L. L. HPV prophylactic vaccination: the first years and what to expect from now. **Cancer Lett.**, v. 305, n. 2, p. 106-112, 2011.
12. ROMANOWSKI, B.; DE BORBA, P. C.; NAUD, P. S. et al. GlaxoSmithkline Vaccine HPV-007 Study Group. Sustained

efficacy and immunogenicity of the human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: analysis of a randomised placebo-controlled trial up to 6.4 years. **Lancet**, v. 374, n. 9706, p. 1975-1985, 2009.

13. FAIRLEY, C. K.; HOCKING, J. S.; GURRIN, L. C. et al. Rapid decline in presentations of genital warts after the implementation of a national quadrivalent human papillomavirus vaccination programme for young women. **Sex Transm. Infect.**, v. 85, n. 7, p. 499-502, 2009.
14. MARKOWITZ, L. E.; DUNNE, E. F.; SARAIYA, M. et al. Quadrivalent human papillomavirus vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recomm. Rep.**, v. 56, n. RR-2, p. 1-24, 2007.
15. National Policy Recommendations and Funding for HPV Vaccines – A Global Summary. Last Reviewed January 12, 2009. Merck & CO, 2009.
16. FDA. Vaccines, Blood & Biologics. Vaccines.: US Federal and Drug Administration; 2010 [updated 2010; cited 2010 jul 31, 2010]; Available from: http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/default.htm.
17. FREGNANI, J. H.; VILLA, L. L. In: HOFF, P. et al. (Eds.). **Tratado de Oncologia**. 1. ed., São Paulo: Atheneu, in press.
18. VAN DER BURG, S. H.; MELIEF, C. J. Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 23, n. 2, p. 252-257, 2011.
19. FRAZER, I. H.; LEGGATT, G. R.; MATTAROLLO, S. R. Prevention and treatment of papillomavirus-related cancers through immunization. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 29, p. 111-138, 2011.
20. LEPIQUE, A. P.; RABACHINI, T.; VILLA, L. L. HPV vaccination: the beginning of the end of cervical cancer? – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 1-10, 2009.
21. CID-ARREGUI, A. Therapeutic vaccines against human papillomavirus and cervical cancer. **Open Virol. J.**, v. 23, n. 3, p. 67-83, 2009.
22. SU, J. H.; WU, A.; SCOTNEY, E. et al. Immunotherapy for cervical cancer: research status and clinical potential. **BioDrugs**, v. 24, n. 2, p. 109-29, 2010.
23. TRIMBLE, C. L.; FRAZER, I. H. Development of therapeutic HPV vaccines. **Lancet Oncol.**, v. 10, n. 10, p. 975-980, 2009.

Capítulo 15

Marcadores Tumorais

Laura Beatriz da Silva Cardeal
Adagmar Andriolo
Silvya Stuchi Maria-Engler

MARCADORES TUMORAIS

Definição de marcador tumoral

A principal estratégia na prevenção e no controle do câncer é a detecção inicial dessa doença o quanto antes possível, permitindo que intervenções e terapias efetivas possam contribuir para a redução da mortalidade e da morbidade. Os biomarcadores ou marcadores tumorais são indicadores celulares do estado fisiológico e de alterações que ocorrem durante o processo de desenvolvimento do câncer. Esses marcadores podem refletir genotoxicidade, hiperproliferação, alteração de padrões de expressão gênica, hiperplasia, inflamação e alterações enzimáticas relacionadas com causas do câncer[1]. Os marcadores tumorais podem ser avaliados em tecidos e células do órgão de origem, em células provenientes de esfoliação, no caso, de marcadores tumorais presentes na circulação, em plasma sanguíneo periférico ou soro ou fluidos corporais como urina, saliva e fluido cerebroespinal[2].

Diferentes marcadores tumorais são verificados em diferentes tipos de câncer, podendo estar alterados níveis do mesmo marcador em mais de um tipo de câncer. Além disso, os níveis de marcadores tumorais podem não estar alterados em todas as pessoas com câncer, principalmente se ele estiver em estágio inicial. Alguns marcadores tumorais podem estar alterados em pacientes que não apresentam câncer[3].

Histórico

O primeiro marcador tumoral utilizado no diagnóstico de uma neoplasia data da metade do século XIX, com a descrição da proteína Bence Jones, detectada na urina. Essa proteína indica a presença de mieloma múltiplo[4,5]. Em 1965, Gold e Freedman[6] demonstraram, pela primeira vez, com sucesso, um teste sanguíneo para marcador tumoral, com a descoberta do CEA no sangue de pacientes com câncer de cólon. A produção de alguns marcadores durante o desenvolvimento fetal levou ao uso do termo antígeno oncofetal[4,5]. No final da década de 1970, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais para imunoensaios levou ao descobrimento de muitos antígenos fetais e antígenos derivados de células tumorais. Esses novos marcadores, entre eles os carboidratos, receberam uma classificação numérica, como CA-125, CA 15-3, CA 19-9, entre outros[3].

Com o avanço das técnicas de biologia molecular (uso de sondas de ácidos nucleicos), foram descobertos oncogenes e genes supressores de tumor que levariam à identificação de mutações genéticas associadas a fenótipo do câncer e seu prognóstico[7]. Portanto, esses genes poderiam atuar como marcadores tumorais, entre eles oncogene *ras*, c-erbB-2, p53 e pRb[4,5].

Aplicações clínicas

Os marcadores tumorais possuem um potencial de amplo uso, como detecção de tumores na população em geral, diagnóstico diferencial, classificação do estágio clínico do câncer, prognóstico da progressão da doença, avaliação do sucesso de tratamento, detecção de recorrência do câncer, monitoramento da terapia, radioimunolocalização da massa tumoral e determinação da direção da imunoterapia[4,5,8].

O biomarcador ideal deve apresentar especificidade, sensibilidade, boa relação custo-benefício, ser de rápido uso e robusto, a fim de possuir pouca intervariabilidade entre instituições e operadores. Além disso, ele tem de demonstrar valor clínico, além daqueles já disponíveis no momento do diagnóstico. Os candidatos a biomarcadores necessitam de validação clínica antes de receberem a aprovação da FDA. Para a maioria dos candidatos a marcadores, esse processo está apenas no começo, pois muitos pré-requisitos, como os descritos anteriormente, ainda não são cumpridos para muitos deles, o que faz com que os marcadores tumorais sejam limitados diante de tantos tumores diferentes[9].

Marcadores de risco

Ajudam na identificação de tumores em indivíduos com alto risco de desenvolverem câncer antes do início biológico da doença. Esses marcadores estão relacionados com a herança genética de anormalidades e suscetibilidade somáticas adquiridas na forma de genes alterados, como mutações nos genes BRCA1/2, relacionados com câncer de mama e ovário, no gene APC e em genes de reparo de *mismatched* (MMR), por exemplo, hMSH2 e hMLH1 em câncer de cólon, pRB em retinoblastoma hereditário e gene TP53, relacionado com produção de proteínas de reparo de DNA, na síndrome de Li-Fraumeni (síndrome complexa caracterizada pela sucessão de tumores independentes)[1,2,10]. Nesses casos, existe uma herança familial que predispõe ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer, entretanto alguns indivíduos que possuem o gene mutado não desenvolvem o câncer. Marcadores de risco relacionados com a herança incluem os polimorfismos genéticos que podem afetar o metabolismo de carcinógenos, como os fumantes que possuem, por exemplo, polimorfismo no gene do citocromo p450; esses indivíduos aumentam sua carga de metabólitos reativos ao fumarem, ocasionando o início de um câncer. Pessoas com esses polimorfismos são encorajadas a mudarem seu estilo de vida, seja na alimentação, seja na exposição à fumaça do tabaco[1,2]. Marcadores de risco indicam que é mais provável que ocorra câncer em indivíduos com essas mutações, em um intervalo de tempo específico, do que na população em geral[2].

Screening e detecção precoce

O objetivo da aplicação de marcadores de *screening* é a detecção de tumores pré e malignos em estágios iniciais o bastante para que possam ser aplicadas intervenções clínicas efetivas. O marcador de *screening* ideal deve ser não invasivo, de baixo custo e robusto o suficiente para permitir que seja aplicado na população. Os marcadores de *screening* e de detecção precoce indicam a presença de tumores iniciais ou que um câncer ocorrerá com aproximadamente 100% de certeza em um intervalo de tempo muito curto[2].

Muitos testes foram desenvolvidos para a detecção precoce do câncer. Entre eles, mamografia para câncer de mama; citologia celular de Papanicolaou (PAP) para o câncer de cólon de útero; sangue oculto nas fezes (FOB), sigmoidoscopia flexível e CEA para câncer colorretal; raios X e citologia de escarro para câncer de pulmão; ultrassonografia e CA-125 para câncer de ovário e exame digital de toque retal (DRE) e antígeno específico de próstata (PSA) para câncer de próstata. Apenas a mamografia, o teste PAP e o teste FOB, quando aplicados na população em geral como *screening*, demonstram redução da mortalidade de câncer local específico. Marcadores de soro como CA-125 e CEA, apesar de serem utilizados na rotina clínica, possuem algumas limitações que serão discutidas posteriormente[1,2].

Diagnóstico

Ainda não há um marcador tumoral que possa ser utilizado sozinho para diagnosticar um tumor. No entanto, o uso dos marcadores, juntamente com a histopatologia, demonstra informações adicionais para diagnóstico diferencial, caracterização de lesões metastáticas de origem primária desconhecida e auxílio para definir diagnósticos incertos ou de casos raros. Entretanto, com exceção do PSA, que é um antígeno específico para o câncer de próstata, esses marcadores ainda não são úteis para a identificação de cânceres primários desconhecidos[2].

Prognóstico

Os marcadores de prognóstico são definidos pelas características clínicas, histopatológicas e moleculares de um tumor e podem ter valor preditivo em relação à progressão tumoral[2]. O sistema de estadiamento (TNM) baseia-se na combinação do tamanho ou da profundidade (T), na propagação do linfonodo (N) e na presença ou ausência de metástase (M) de um tumor. Esse sistema fornece a base para a predição da sobrevivência, escolha do tratamento inicial, estratificação de pacientes em testes clínicos e uniformização dos dados entre os centros de saúde e no final de um tratamento de câncer.

No entanto, por conta da grande variabilidade na sobrevivência de pacientes com o mesmo tipo de câncer, descobriram-se marcadores moleculares que aumentam a acurácia na subclassificação desses pacientes e de seus tipos de câncer. Os marcadores que auxiliam no TNM não necessitam ser específicos, como os para risco, *screening* e detecção precoce[9].

Seleção de tratamento e alvo para terapia

Marcadores para seleção de tratamento possuem um alto valor preditivo, uma vez que os pacientes respondem melhor e obtêm benefícios de uma terapia específica[2]. Os marcadores tumorais auxiliam na escolha da terapia mais eficiente para um determinado tipo de tumor. Exemplos proeminentes incluem tumores positivos para CD20 no tratamento de linfomas com rituximabe; HER2/NEU positivos para câncer de mama com trastuzumabe e/herceptina; translocação BCR-ABI para leucemia mielogênica crônica (CML) com imatinibe, entre outros. Alguns desses marcadores estão aprovados pela FDA e são utilizados na clínica oncológica, no monitoramento, como CA19-9 (pâncreas), CA-125 (ovário), CA 15-3 (mama) e CEA (cólon); no *screening*, como PAP (colo do útero) e HER2/NEU (mama); e na seleção de trata-

mento, como HER2/NEU e receptores de estrógeno e progesterona (mama), além de outros que são utilizados apenas para pesquisa[9].

Metástase e recorrência

O monitoramento dos marcadores para detecção de metástase e de recorrência após ressecção cirúrgica do tumor é uma das maiores aplicações dos marcadores tumorais. Uma vez que existem terapias para recorrência e metástase, a detecção inicial melhoraria as consequências dessa doença[2,11].

AVALIAÇÃO DOS MARCADORES TUMORAIS

Sensibilidade *versus* especificidade

O uso dos marcadores tumorais está quase totalmente dependente da sensibilidade e da especificidade desse marcador. A sensibilidade está relacionada, molecularmente, com a quantidade mínima de substrato necessária para detectar o câncer. Em relação aos pacientes, se todos com o mesmo tipo de câncer podem ser detectados. A especificidade está relacionada com a porcentagem dos ensaios que conseguem distinguir entre amostras ou pacientes normais dos que possuem câncer. Altos níveis de sensibilidade podem reduzir a especificidade, levando à detecção de pacientes ou amostras falso-positivas. Alternativamente, uma sonda altamente específica pode não ser muito sensível e não detectar todo o substrato ou pacientes presentes, causando falso-negativo. A sensibilidade e a especificidade são inicialmente estabelecidas em estudos altamente controlados, utilizando amostras que possuem uma quantidade conhecida de substrato[7]. Entretanto, ainda não há nenhum marcador tumoral que seja 100% sensível e específico, o que seria o ideal de um marcador tumoral.

Valores de referência

Os valores de referência de um marcador tumoral são obtidos a partir de uma população saudável, preferencialmente com idade e sexo comparáveis entre os indivíduos. A determinação dos valores de referência é tempo-dependente e necessita de uma população grande e saudável ($n \geq 120$ indivíduos). A análise estatística usa a média +/– desvio padrão de uma população com distribuição de Gauss (normal) na maioria dos métodos utilizados. Em testes com aplicações específicas, como os marcadores tumorais, utiliza-se o nível de decisão em relação ao maior limite saudável de uma população. O nível de decisão pode ser determinado pelo uso do modelo de valor preditivo[5].

Modelo de valor preditivo

Usa a sensibilidade, a especificidade e a prevalência da doença. O nível de decisão considerado ótimo é selecionado com base na importância da detecção da doença, na habilidade do tratamento dessa doença e nos custos e dor associados aos testes e ao tratamento[5]. A metodologia utilizada para avaliação de testes múltiplos para marcadores múltiplos ou determinado marcador, considerando-se um mesmo tipo de câncer, é a curva ROC[5]. Esta é muito utilizada em testes de diagnóstico médico, a fim de avaliar o desempenho de classes binárias com produtos contínuos, i. e., determinar o limite entre o saudável e o doente, com a razão verdadeiro-positivo e falso-positivo[12]. A curva ROC é construída plotando os valores de sensibilidade × 1-especificidade, mostrando vários níveis quantitativos de decisão. O nível de decisão pode ser apontado onde o ótimo da sensibilidade e da especificidade é alcançado[5]. Como exemplo de curva ROC, observa-se, em um estudo com pacientes com câncer gástrico, a determinação da especificidade e da sensibilidade de quatro marcadores tumorais, dois considerados clássicos – CEA e CA 19-9 – e dois relacionados com papel potencial no crescimento e na progressão desse tipo de tumor – IL-6 e CRP. Na análise da curva ROC (Fig. 15.1), IL-6 tem a maior área (0,8984) abaixo da curva ROC, seguida da CRP (0,8075) e muito maior que CEA (0,7737) e CA 19-9 (0,7619) em pacientes com carcinoma gástrico. Esses dados mostram que a IL-6 e a CRP têm maior

978-85-4120-024-0

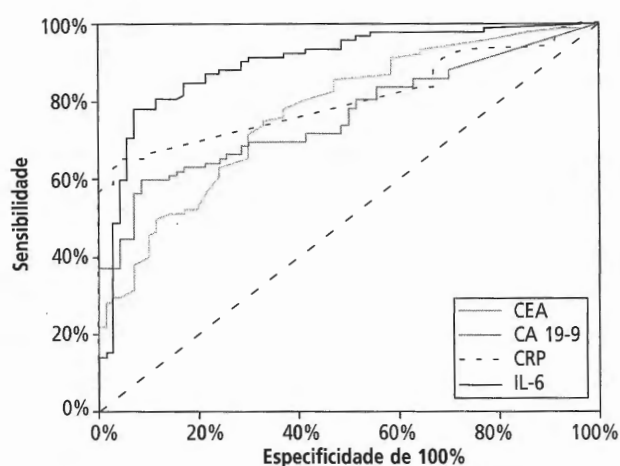



Figura 15.1 – Exemplo de curva ROC. Áreas abaixo das curvas ROC para IL-6 (AUC = 0,8984, *p* < 0,001), CRP (AUC = 0,8075, *p* < 0,001) e marcadores tumorais – CEA (AUC = 0,7737, *p* < 0,001) e CA 19-9 (AUC = 0,7619, *p* < 0,001) em pacientes com carcinoma gástrico. Modificada de Lukaszewicz-Zajac *et al.*[13].

valor diagnóstico, por possuírem maior sensibilidade e especificidade para câncer gástrico que os outros dois marcadores clássicos[13].

Distribuição dos valores dos marcadores

A aplicação do modelo de valor preditivo é difícil, pois um marcador pode diagnosticar mais de um tipo de doença. Além disso, a maioria dos marcadores está aumentada em mais de uma doença. Quando o modelo de valor preditivo é utilizado, são inclusos grupos com e sem a doença, mas indivíduos com a doença, em estágio inicial ou sem metástase, devem sem incluídos? Os cálculos dos valores de sensibilidade e especificidade dependem muito dos tipos de grupos e do número de indivíduos em cada grupo que são incluídos nos estudos. A distribuição dos valores dos marcadores tumorais é determinada em relação à porcentagem de indivíduos com valores elevados em relação aos valores de corte nas condições saudável, tumor benigno e tumor maligno. Os pacientes com câncer são classificados de acordo com os critérios internacionais de estadiamento dos tipos de câncer, e o diagnóstico é dado de acordo com as características patológicas. Outros fatores podem atuar na distribuição dos valores dos marcadores tumorais, como uso de medicamentos, fumo, raça e idade. Como exemplo, os valores normais de PSA variam com idade e raça do paciente. O valor mais utilizado de normalidade para esse marcador é 4 ng/mℓ[14,15], mas, em alguns casos, ele pode apontar um falso-positivo, por exemplo, homens caucasianos entre 70 e 79 anos, em que, entre 0 e 6,5 ng/mℓ de PSA, é considerado normal; e em outro um falso-negativo, por exemplo, em homens japoneses na faixa etária dos 40 a 49 anos, em que, entre 0 e 2 ng/mℓ, é uma faixa normal para esse marcador.

Tratamento da doença

A maioria dos marcadores tumorais é utilizada para monitorar o tratamento e a progressão do câncer. Para o monitoramento efetivo de uma terapia do câncer, é necessário que os valores de um marcador tumoral aumentem com a progressão e diminuam com a regressão do câncer e se mantenham sem modificação quando a doença se estabiliza. Para a avaliação de um marcador tumoral, esses fatores são levados em consideração. A mudança nos valores dos marcadores é interpretada de acordo com critérios internacionais[5]. A Sociedade Internacional para Biologia e Medicina do Oncodesenvolvimento (ISOBM)[16] determina alguns desses critérios: “Se não houve terapia, para ser considerado recorrência do tumor, o valor do marcador deve aumentar linearmente em três amostras consecutivas. Depois do primeiro aumento, as próximas amostras devem ser colhidas depois de 2 a 4 semanas, independente do valor absoluto”. Se a terapia foi iniciada, mudanças no valor do marcador tumoral podem indicar uma progressão tumoral. “A progressão do câncer é definida quando o valor do marcador tumoral aumenta mais que 25%”, e a diminuição de 50% no valor do marcador tumoral é indicativa de remissão parcial “considerando os marcadores detectados no soro”, no entanto “uma completa remissão não pode ser determinada pelo nível do marcador tumoral”.

TECNOLOGIAS AVANÇADAS/ DESCOBRIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES

As tecnologias avançadas de detecção, que podem analisar simultaneamente padrões de expressão de muitos genes e proteínas, são utilizadas para procurar marcadores moleculares para o câncer[7].

Genômica

Pode ser definida como a medida da expressão de uma sequência gênica disponível. O perfil do padrão de expressão representa o fenótipo e a função de uma célula, conhecido como transcriptoma. Microarranjos de oligonucleotídios de cDNA e SAGE são técnicas utilizadas na genômica[1]. A análise de microarranjos é, atualmente, uma das formas mais comuns de detecção de mudanças no padrão de expressão gênica de células normais e tumorais e em diferentes tipos de câncer[7]. Em um estudo de perfil de expressão gênica em célula de medula óssea, foi utilizado um *chip* de microarranjos que contém sonda para 6.817 genes. Nesse estudo, foi possível diferenciar pacientes com leucemia mieloide aguda (AML) daqueles com leucemia linfoblástica aguda (ALL), pois o arranjo detectou 50 genes diferencialmente expressos nesses dois tipos de leucemias[17]. Os arranjos podem ser usados em diferentes tipos de tumores que são difíceis de serem classificados e explicar por que certos tipos de tumores, do mesmo tipo, possuem histórias naturais muito distintas[1].

A análise de SAGE difere do microarranjo, uma vez que o padrão de expressão identifica não apenas os genes diferencialmente expressos, mas também quantifica o nível de expressão desses genes. Por intermédio da SAGE, foram identificadas expressões diferenciadas em câncer de não pequenas células de pulmão, gastrintestinal, de mama[1] e de câncer pancreático, para o qual foi identificado um novo marcador, a mesotelina, proteína de membrana[18]. A identificação de características genéticas individuais pela genômica tem ajudado a predizer uma resposta para terapia; por exemplo, a identificação do oncogene HER2 amplificado em câncer de mama, o qual está associado a um pior prognóstico, ajuda na escolha da melhor estratégia terapêutica. Bibliotecas de SAGE levaram à formação de bancos de dados que podem ser consultados para estudos de diagnóstico e prognóstico[1].

Proteômica

Detecta a funcionalidade das proteínas celulares, refletindo tanto a programação intrínseca da célula quanto a atuação do meio ambiente, dessa forma tentando detectar alguma proteína com papel de biomarcador tumoral. Muitas alterações distintas podem ocorrer em uma proteína durante a transformação de uma célula normal em tumoral, incluindo alteração de expressão, modificação conformacional, no sítio ativo, e localização incorreta, afetando o funcionamento celular[1]. Técnicas avançadas de espectroscopia de massa são empregadas para comparar padrões proteicos entre amostras de tecidos normais e cancerosos e para detectar o câncer em alguns pacientes. Tecnologias como MALD-TOF ou LC-MS/MS revolucionaram a análise proteica. Nessas técnicas, amostras de proteínas, provenientes de soro, células e tecido tumorais de pacientes, são fracionadas e digeridas com enzimas proteolíticas, separadas por métodos cromatográficos e analisadas pela espectroscopia de massa. O espectro proteômico específico do tumor é determinado pela combinação da análise da massa de peptídios com sequências parciais de peptídios, em conjunção com um banco de dados, formando algoritmos[8].

Esses algoritmos têm apresentado sucesso em relação a proteínas provenientes de soro de pacientes com câncer de ovário, mama e próstata, com sensibilidade e especificidade maiores que 90%[2,7]. Outra técnica que pode ser utilizada é o TMA, que permite análise *in situ* dos níveis de centenas ou milhares de DNA, RNA ou proteínas extraídos de blocos de tumores primários[2]. Três tipos de TMA são utilizados na pesquisa do

câncer: prevalência, progressão e prognóstico. Os TMA de progressão mostram associações entre tumor de mama e superexpressão de HER2, expressão de E-caderina e tamanho do tumor de próstata. Os TMA de prognóstico mostram associações entre alterações moleculares e prognóstico de pacientes, como câncer de mama, expressão de *COX2*, carcinoma hepatocelular, *MYC* (*myelocytomatosis oncogene*), entre outros[19].

A investigação de padrões moleculares pode mensurar a agressividade de um tumor, ajudar a prever seu estadiamento, aperfeiçoar a classificação tumoral e proporcionar meios de monitoramento do tumor em resposta a uma terapia. As diferenças mostradas entre os tumores ajudam na escolha, por exemplo, do melhor agente quimioterápico a ser administrado ao paciente, promovendo o desenvolvimento de uma medicina mais individualizada em relação à prevenção, à detecção precoce e à responsividade a drogas. Além disso, essas técnicas permitem a detecção dos biomarcadores utilizando técnicas tradicionais não invasivas, como retirada de sangue, fluidos, esfoliação de células (aerodigestivo/bucal), coleta de urina, fezes e saliva[1]. No entanto, deve-se enfatizar que, para o uso de técnicas promissoras provenientes da genômica e da proteômica, os métodos devem estar validados por um grande número de estudos criteriosos na coleta e na manutenção das amostras de pacientes[2].

TIPOS ESPECÍFICOS DE MARCADORES TUMORAIS

Entre os marcadores tumorais validados para estudos em câncer, podem-se citar, por exemplo: o CEA como marcador de sobrevivência para câncer colorretal; a alfafetoproteína, a β-HCG e a LDH como marcadores de prognóstico para tumores de células germinativas não seminomatosas e o CA-125 como marcador de monitoramento de terapia para câncer de ovário[20].

No entanto, ainda não há um marcador validado, em uso na rotina clínica, para o diagnóstico, o prognóstico, a avaliação do tratamento e a recorrência do câncer cervical[21].

CEA

Os antígenos oncofetais são proteínas expressas em altas concentrações no soro de fetos, diminuindo ou praticamente desaparecendo após o nascimento. Em pacientes com determinados tipos de câncer, essas proteínas reaparecem na circulação, indicando que alguns genes foram reativados em decorrência da formação de uma neoplasia. Os antígenos oncofetais mais utilizados são o CEA e a alfafetoproteína.

O CEA foi descoberto por Gold and Freedman[6] como um antígeno expresso tanto em adenocarcinoma de cólon como em cólon de fetos, mas ausente em cólon de adulto saudável. Uma vez que sua expressão parecia estar restrita a tecidos tumorais e embrionários, adotou-se o nome antígeno carcinoembriônico. O CEA pertence a uma família de glicoproteínas de membrana, sendo sua principal proteína. Sua massa molecular está entre 150 e 300 kDa, pois existem variabilidades em sua glicosilação[2].

O CEA é utilizado como marcador tumoral em pacientes com carcinoma cervical há muitos anos, com sensibilidade entre 22% e 58%. Apesar de alguns autores terem mostrado correlação entre níveis séricos de CEA e aumento do carcinoma cervical, ainda não está claro se o CEA pode ser utilizado como marcador de diagnóstico ou auxiliar no prognóstico e resposta ao tratamento[22]. No entanto, quando analisado em conjunto com o carcinoma de células escamosas (SCC, *squamous cell carcinoma*), os níveis de ambos os marcadores podem ser utilizados como marcadores de prognóstico e monitoramento do tratamento clínico de carcinomas escamosos[22].

Os pacientes com adenocarcinoma cervical algumas vezes apresentam níveis elevados de CEA e de CA 19-9 (um marcador do tipo carboidrato)[20], sendo a combinação desses dois marcadores promissora na detecção da recorrência de adenocarcinomas. Para carcinomas adenoescamosos, recomenda-se o uso adicional do marcador SCC[23].

Além disso, o CEA está elevado em condições benignas como cirrose, enfisema pulmonar, pólipos retais, colite ulcerativa e doenças benignas de mama e em fumantes[2,5,24]. Em razão da

associação entre altos níveis de CEA e doenças benignas, ocasionando resultados falso-positivos, o CEA não é indicado para teste diagnóstico e de *screening*[3,5]. Os valores de 5 ng/mℓ são considerados os limites máximos de normalidade para o CEA[25].

CA-125

Os marcadores tumorais relacionados com carboidratos são antígenos presentes na superfície das células tumorais ou são secretados por essas células. Esses antígenos foram descobertos com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais. Os antígenos relacionados com CA podem ser divididos em dois grupos: os carboidratos de alto peso molecular do tipo mucina e os do grupo sanguíneo, que são assim denominados por possuírem carboidratos do tipo sialil, que estão envolvidos na adesão das células tumorais ao endotélio vascular[5,26].

O antígeno CA-125 é uma glicoproteína do tipo mucina, expressa por tecidos derivados do epitélio celômico, e está associado ao carcinoma de ovário e endométrio. O CA-125 é reconhecido pelo anticorpo monoclonal OC125, desenvolvido mediante a imunização de camundongos com a linhagem celular de carcinoma de ovário humano OVCA433[5,11,27,28]. O valor de referência pode variar entre 30 e 35 U/mℓ, com sensibilidade entre 50% e 60% na doença inicial e especificidade de 99% em uma população de mulheres saudáveis menopausadas. Em mulheres com câncer de ovário, 80% apresentaram níveis de CA-125 > 35 U/mℓ, com elevação de 50% no estadiamento I, 90% no II e > 90% nos estadiamentos III e IV[28].

O CA-125 apresenta níveis aumentados em torno de 20 a 75% entre os pacientes com adenocarcinoma cervical, antes do tratamento, refletindo o estadiamento e o tamanho do tumor, o grau histológico, a invasão cervical estromal e o acometimento do espaço linfovascular e dos linfonodos. Níveis séricos elevados de CA-125 também podem ser observados em pacientes com carcinoma escamoso cervical, apresentando as mesmas correlações. No entanto, em taxas menores, comparando-se ao adenocarcinoma[20,29].

Os níveis de CA-125 podem ter relevância como marcador de prognóstico, pois os níveis séricos aumentados desse marcador precedem e são coincidentes com o diagnóstico de recorrência do adenocarcinoma cervical, sendo verificados, em níveis acima de 35 U/mℓ de CA-125, em todos os pacientes com recorrência da doença[30]. Em um estudo retrospectivo de pacientes com adenocarcinoma utilizando três marcadores (CA-125, CEA e SCC), foi demonstrado que, em 74% dos 23 pacientes com pelo menos um marcador sérico aumentado após três meses de terapia, ainda havia tumor residual ou recorrência, em comparação com 15% dos pacientes com níveis normais dos marcadores. O aumento de pelo menos um marcador foi observado em 86% dos pacientes com recorrência vaginal, ao passo que os níveis elevados de CA-125 foram mesurados em 100% dos pacientes com recorrência abdominal[31].

No entanto, o CA-125 pode ser detectado em tecidos adultos normais, como nas tubas uterinas, no endométrio, na endocérvice e no peritônio. Além disso, sua especificidade não é ótima, uma vez que também pode ser observado em condições benignas, ginecológicas ou não, como endometriose, doença da inflamação pélvica, hepatite, pancreatite e falência renal, assim como em condições malignas, como câncer de pulmão, pâncreas e linfoma não Hodgkin[20]. O CA-125 não é recomendado para detecção de populações assintomáticas, além de não diferenciar o câncer de ovário (principal tipo tumoral associado) de outras malignidades[28].

VEGF

O VEGF é considerado um dos fatores moleculares mais importantes na formação de novos vasos. A molécula de VEGF é uma glicoproteína de 45 kDa, também conhecida como VPF ou VEGF-A, pertencente a uma família multigênica de potentes reguladores angiogênicos, composta de outros quatro membros: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PIGF[32]. O VEGF estimula

o crescimento, a migração e a diferenciação das células endoteliais precursoras, assim como a morfogênese de vasos sanguíneos, seja por vasculogênese, seja por angiogênese[33].

A formação de novos vasos sanguíneos é essencial em diversos processos fisiológicos (cicatrização) e patológicos (câncer)[34]. O câncer faz parte de um grupo de doenças conhecidas coletivamente como "doenças com um componente angiogênico", pois se utilizam da angiogênese para progredir no organismo[34,35]. Muitos trabalhos tentam estabelecer uma associação entre VEGF e progressão do carcinoma cervical.

A expressão de VEGF, analisada mediante ensaios de imunoistoquímica, demonstrou que esse fator pode ser um marcador de prognóstico para sobrevivência livre da doença em pacientes com carcinoma cervical avançado. Adicionalmente, foi demonstrado que a alta expressão de VEGF em tumores nos estágios I e II está associada a indicadores de pior prognóstico, como tamanho do tumor, metástase de linfonodos pélvicos e invasão linfovascular[36], sugerindo que o VEGF poderia ser utilizado como marcador prognóstico para esse tumor.

Altos níveis séricos de algumas isoformas de VEGF, como VEGF-C, são observados em pacientes com carcinoma cervical[20]. Altos níveis de VEGF-C (> 4.436 pg/mℓ) são verificados de acordo com a progressão do carcinoma – níveis esses não observados em amostras normais e em ASC-US –, 10% observados em biópsias ASC-US e NIC, 20 a 27% em biópsias NIC II e III ou estágio inicial do câncer cervical, 57% dos casos de carcinoma em estágio avançado e em 69% dos casos de carcinoma cervical persistente após tratamento[37].

Além de serem sugeridas como marcadores de prognóstico, as isoformas de VEGF também podem ser utilizadas como marcador de monitoramento de tratamento. Em um estudo com 23 pacientes com carcinoma cervical nos estágios Ib-IVa tratados com radioterapia, a média de progressão da doença foi de 5 meses para aqueles com níveis séricos de VEGF > 244 pg/mℓ, comparada com 19 meses para aqueles pacientes com menores níveis de VEGF ($p = 0{,}003$)[38].

Recentemente, algumas drogas antiangiogênicas como o bevacizumabe (Avastin®) são utilizadas no tratamento do carcinoma cervical[39]. O monitoramento do VEGF, alvo desse medicamento, poderia mostrar o real efeito dessa terapia. Assim, esperar-se-ia que esse marcador diminuísse com a regressão do câncer e se mantivesse sem modificação quando da estabilização da doença. No entanto, ainda são necessários estudos para comprovar o uso do VEGF como um marcador para o carcinoma cervical.

Referências

1. SRINIVAS, P. R.; KRAMER, B. S.; SRIVASTAVA, S. Trends in biomarker research for cancer detection. **Lancet Oncol.**, v. 2, n. 11, p. 698-704, 2001. Review.
2. BIGBEE, W.; HERBERMAN, R. B. Tumor markers and immunodiagnosis. Cap. 13. p. 209-220. In: HOLLAND, J. F.; FREI, E. **Cancer Medicine 6th Review:** a companion to Holland-Frei. Cancer Medicine, v. 6, 2003.
3. Disponível em: http://www.cancer.gov. Acesso em: 15 jan. 2011.
4. PITOT, H. C.; LOEB, D. D. The host-tumor relationship – nutritional factors and biomarkers. In: **Fundamentals of Oncology**, 4. ed., New York: M. Dekker, 2002. p. 998.
5. CHAN, D. W.; STEWART, S. Tumor markers. Cap. 21. p. 390-413 In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BORDER, B. **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry**, 5. ed., Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. p. 1091.
6. GOLD, P.; FREEDMAN, S. O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. **J. Exp. Med.**, v. 122, n. 3, p. 467-481, 1965.
7. SIDRANSKY, D. Emerging molecular markers of cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 3, p. 210-219, 2002. Review.
8. Disponível em: http://www.cancer.org/Treatment/UnderstandingYourDiagnosis/ExamsandTestDescriptions/TumorMarkers/tumor-markers-how-t-m-used. Acesso em: 12 fev. 2011.
9. LUDWIG, J. A.; WEINSTEIN, J. N. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, n. 11, p. 845-856, 2005. Review.
10. PALMERO, E. I.; ACHATZ, M. I.; ASHTON-PROLLA, P. et al. Tumor protein 53 mutations and inherited cancer: beyond Li-Fraumeni syndrome. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 22, n. 1, p. 64-69, 2010. Review.
11. WU, J. T. Circulating tumor markers: basic concepts and clinical applications, Cap. 30. p. 604-616. In: BISHOP, M. L.; FODY, E. P.; SCHOEFF, L. **Clinical Chemistry. Principles, Procedures, Correlations**, 5. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p. 730.
12. BRUMBACK, L. C.; PEPE, M. S.; ALONZO, T. A. Using the ROC curve for gauging treatment effect in clinical trials. **Stat. Med.**, v. 25, n. 4, p. 575-590, 2006.
13. LUKASZEWICZ-ZAJAC, M.; MROCZKO, B.; GRYKO, M. et al. Comparison between clinical significance of serum proinflammatory proteins (IL-6 and CRP) and classic tumor markers (CEA and CA 19-9) in gastric cancer. **Clin. Exp. Med.**, v. 11, n. 2, p. 89-96, 2011. Epub 2010 Oct 12.

14. Disponível em: http://www.tc-cancer.com/tumormarkers.html. Acesso em: 12 fev. 2011.
15. Disponível em: www.fleury.com.br. Acesso em: 12 fev. 2011.
16. BONFRER, J. M. G. Working group on tumor marker criteria (WGTMC). **Tumor Biol.**, v. 11, p. 287-288, 1990.
17. GOLUB, T. R.; SLONIM, D. K.; TAMAYO, P. et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. **Science**, v. 286, n. 5439, p. 531-537, 1999.
18. ARGANI, P.; IACOBUZIO-DONAHUE, C.; RYU, B. et al. Mesothelin is overexpressed in the vast majority of ductal adenocarcinomas of the pancreas: identification of a new pancreatic cancer marker by serial analysis of gene expression (SAGE). **Clin. Cancer Res.**, v. 7, n. 12, p. 3862-3868, 2001.
19. SIMON, R.; MIRLACHER, M.; SAUTER, G. Tissue microarrays. **Biotechniques**, v. 36, n. 1, p. 98-105, 2004. Review.
20. GADDUCCI, A.; TANA, R.; COSIO, S. et al. The serum assay of tumour markers in the prognostic evaluation, treatment monitoring and follow-up of patients with cervical cancer: a review of the literature. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 66, n. 1, p. 10-20, 2008. Epub 2007 Oct 26. Review.
21. STURGEON, C. M.; DUFFY, M. J.; HOFMANN, B. R. et al. National Academy of Clinical Biochemistry. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for use of tumor markers in liver, bladder, cervical, and gastric cancers. **Clin. Chem.**, v. 56, n. 6, p. e1-e48, 2010. Epub 2010 Mar 5.
22. YOON, S. M.; SHIN, K. H.; KIM, J. Y. et al. The clinical values of squamous cell carcinoma antigen and carcinoembryonic antigen in patients with cervical cancer treated with concurrent chemoradiotherapy. **Int. J. Gynecol. Cancer**, v. 17, n. 4, p. 872-878, 2007. Epub 2007 Mar 2.
23. TABATA, T.; TAKESHIMA, N.; TANAKA, N. et al. Clinical value of tumor markers for early detection of recurrence in patients with cervical adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma. **Tumour Biol.**, v. 21, n. 6, p. 375-380, 2000.
24. Disponível em: http://www.labtestsonline.org. Acesso em: 12 fev. 2011.
25. MOLINA, R.; FILELLA, X.; AUGE, J. M. et al. CYFRA 21.1 in patients with cervical cancer: comparison with SCC and CEA. **Anticancer Res.**, v. 25, n. 3A, p. 1765-1771, 2005.
26. KANNAGI, R.; IZAWA, M.; KOIKE, T. et al. Carbohydrate--mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. **Cancer Sci.**, v. 95, n. 5, p. 377-384, 2004. Review.
27. ANDRIOLO, A. Marcadores tumorais bioquímicos circulantes. p. 663-673. In: GUIMARÃES, J. R. Q. et al. (Org.). **Manual de Oncologia**, 1. ed., São Paulo: Libbs Farmacêutica Ltda., v. 1, 2004. p. 725.
28. CHAN, D. W.; IE-MING, S.; SOKOLL, L. J. et al. **National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumor Markers in Ovarian Cancer**. NACB: Practice Guidelines and Recommendations for Use of Tumor Markers in the Clinic Ovarian Cancer (Section 3E), 2006. p. 1-21.
29. TAKEDA, M.; SAKURAGI, N.; OKAMOTO, K. et al. Preoperative serum SCC, CA125, and CA19-9 levels and lymph node status in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 81, n. 5, p. 451-457, 2002.
30. NILOFF, J. M.; KNAPP, R. C.; SCHAETZL, E. et al. CA125 antigen levels in obstetric and gynecologic patients. **Obstet. Gynecol.**, v. 64, n. 5, p. 703-707, 1984.
31. DUK, M.; AALDERS, J. G.; FLEUREN, G. J. et al. Tumor markers CA 125, squamous cell carcinoma antigen, and carcinoembryonic antigen in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix. **Obstet. Gynecol.**, v. 73, p. 661-668, 1989.
32. ADAMS, R. H.; ALITALO, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, p. 464-478, 2007.
33. CARMELIET, P.; FERREIRA, V.; BREIER, G. et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. **Nature**, v. 380, p. 435-439, 1996.
34. FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 6, p. 273-286, 2007.
35. CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat. Med.**, v. 9, p. 653-660, 2003.
36. DELLI, C. J.; KARAM, A. K.; MONTGOMERY, L. Vascular endothelial growth factor and its relationship to the prognosis and treatment of breast, ovarian, and cervical cancer. **Angiogenesis**, v. 13, n. 1, p. 43-58, 2010. Epub 2010 Mar 14. Review. Erratum in: **Angiogenesis**, v. 13, n. 3, p. 279, 2010. Carpini, Jennifer Delli [corrected to Delli Carpini, Jennifer].
37. MATHUR, S. P.; MATHUR, R. S.; GRAY, E. A. et al. Serum vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) as a specific biomarker for advanced cervical cancer: relationship to insulin-like growth factor II (IGF-II), IGF binding protein 3 (IGF-BP3) and VEGF-A [corrected]. **Gynecol. Oncol.**, v. 98, n. 3, p. 467-483, 2005. Erratum in: **Gynecol. Oncol.**, v. 101, n. 1, p. 186, 2006.
38. BACHTIARY, B.; SELZER, E.; KNOCKE, T. H. et al. Serum VEGF levels in patients undergoing primary radiotherapy for cervical cancer: impact on progression-free survival. **Cancer Lett.**, v. 179, n. 2, p. 197-203, 2002.
39. MONK, B. J.; SILL, M. W.; BURGER, R. A. et al. Phase II trial of bevacizumab in the treatment of persistent or recurrent squamous cell carcinoma of the cervix: a gynecologic oncology group study. **J. Clin. Oncol.**, v. 27, n. 7, p. 1069-1074, 2009. Epub 2009 Jan 12.

Capítulo 16

Biomarcadores na Triagem do Câncer de Colo Uterino e Lesões Precursoras

Lara Termini

INTRODUÇÃO

Os biomarcadores tumorais são indicadores do estado fisiológico e de alterações que ocorrem durante o processo neoplásico. A expressão desses marcadores pode refletir diversos processos em andamento nas células tumorais, como hiperproliferação, alteração de padrões de expressão gênica, hiperplasia, genotoxicidade, inflamação e alterações enzimáticas relacionadas com o desenvolvimento tumoral, entre outros. Um biomarcador tumoral ideal possui relação direta com o processo maligno, correlaciona-se com a massa tumoral, permite a caracterização do tipo de tumor, localização, estadiamento do tumor, bem como fornece avaliação prognóstica do tumor em questão[1]. Determinar o risco de desenvolvimento, prognóstico, bem como o sucesso de tratamento em resposta a uma determinada medicação e/ou procedimento, constitui a principal razão para a identificação de marcadores biológicos ou biomarcadores. Nesse sentido, um dos exemplos clássicos diz respeito ao prognóstico das neoplasias malignas, cuja identificação tornou-se um dos maiores desafios da medicina moderna. A principal estratégia na prevenção e no controle desse tipo de doença é sua detecção precoce, permitindo que intervenções e terapias efetivas possam contribuir para a redução da mortalidade e da morbidade por câncer.

Ao longo das últimas duas décadas, diversos estudos epidemiológicos e laboratoriais demonstraram que o carcinoma do colo uterino é uma doença complexa com múltiplos determinantes ambientais e genéticos. As infecções genitais, especialmente as associadas ao HPV de alto

risco, e o comprometimento da resposta imune celular são fatores diretamente envolvidos no processo de transformação maligna[2]. O carcinoma do colo uterino apresenta-se como a segunda neoplasia mais prevalente entre a população feminina mundial, responsável por cerca de 250.000 mortes a cada ano no mundo. No Brasil, essa neoplasia situa-se como a terceira mais comum entre a população feminina, apenas suplantada pelo câncer de pele (não melanoma) e o de mama, sendo a quarta causa de morte feminina por câncer[3]. O desenvolvimento do câncer do colo uterino está diretamente relacionado com a infecção persistente pelo HPV[4]. Estimativas mundiais indicam que aproximadamente 20% dos indivíduos normais estão infectados com HPV e que, a cada ano, surgem em torno de 500.000 casos novos de câncer de colo uterino, dos quais em torno de 70% em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Além disso, acredita-se que, nessas regiões, ocorra de 10 a 20 vezes mais lesões precursoras desse tipo tumoral, o que significa um número elevado de indivíduos acometidos por essa doença[5].

Atualmente, existem dois tipos de vacinas profiláticas. A bivalente previne a infecção e as doenças causadas pelos HPV 16 e 18, ao passo que a tetravalente protege contra os HPV 6, 11, 16 e 18. A utilização dessas vacinas prevê a redução significativa na mortalidade e na morbidade associadas às infecções por HPV, que afetam centenas de milhões de indivíduos a cada ano em todo o mundo[6-9]. Apesar da alta eficácia comprovada dessas vacinas e de sua promissora utilização, vale a pena ressaltar suas limitações. Elas não protegem contra todos os tipos de HPV e não tratam lesões preexistentes HPV-positivas. Além disso, a duração de seu efeito protetor ainda não está estabelecida, por conta de os estudos ainda estarem em andamento. A durabilidade do efeito dessas vacinas foi avaliada por apenas cinco anos para a vacina quadrivalente[10] e por seis anos e meio para a vacina bivalente[7,11]. Atualmente, diversos grupos em todo o mundo testam estratégias para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra o HPV, uma vez que as vacinas profiláticas não têm efeito na eliminação de lesões e tumores do colo uterino associados ao HPV. O objetivo desses estudos é a quebra da tolerância estabelecida por proteínas virais e a promoção de resposta imune celular contra antígenos de HPV, principalmente as proteínas E6 e E7. Existem estudos clínicos em andamento com vacinas desenvolvidas contra peptídios de E6 e E7 de HPV 16, mas nenhum deles tem resultados definitivos. Resultados preliminares mostram o surgimento de populações de linfócitos CD4 e CD8 responsivos aos antígenos virais E6 e E7, que têm capacidade de produção de IFN-α[12].

Pelo exposto, a identificação e a utilização de ferramentas que possam complementar tanto o diagnóstico como o rastreamento das lesões precursoras do câncer do colo uterino são ainda de suma importância. Uma vez que a grande maioria das lesões precursoras do câncer do colo uterino regride espontaneamente, a identificação de lesões que realmente necessitem ser tratadas evitaria a utilização de tratamentos agressivos desnecessários, ao passo que lesões com maior chance de progredirem seriam passíveis de tratamento antes do desenvolvimento de câncer invasivo[13,14].

978-85-4120-024-0

TESTES VIGENTES NO RASTREAMENTO DE LESÕES DO COLO UTERINO

Exame de Papanicolaou (citologia oncótica)

O exame de citologia oncótica (Papanicolaou) ainda constitui o principal método utilizado para a detecção do câncer do colo uterino e de suas lesões precursoras. Essa técnica, descrita por George Papanicolaou em 1941, consiste na avaliação morfológica das células de esfregaços obtidos da superfície do colo uterino. Diversos critérios são utilizados para a avaliação do grau de alteração das células. Entre eles, relação núcleo/citoplasma, formato nuclear, intensidade de marcação nuclear e arquitetura da cromatina. Atualmente, a classificação de Bethesda é uma das mais utilizadas para o diagnóstico citológi-

co das amostras provenientes do colo uterino, categorizando as células anormais em LSIL e HSIL[15]. As lesões de baixo grau representam, na sua grande maioria, modificações morfológicas associadas à replicação ativa do HPV (p. ex., a coilocitose), ao passo que as lesões de alto grau indicam a transformação celular, caracterizada, principalmente, por alterações nucleares. Amplos estudos epidemiológicos demonstram grande impacto na redução das taxas de incidência do câncer do colo uterino e de suas lesões precursoras, quando utilizada essa metodologia para o rastreamento dessa doença[5].

Apesar de sua grande especificidade, essa metodologia possui sensibilidade limitada na detecção de lesões precursoras do colo uterino, fato atribuível à variação da interpretação desse método, que apresenta variabilidade de 34 a 94% na detecção de lesões de alto grau, além de não ser determinante na classificação das amostras atípicas definidas como ASC-US[16]. A repetição desse tipo de exame faz-se necessária para compensar sua baixa sensibilidade, opção utilizada na clínica e que permite rastrear com maior segurança mulheres que, porventura, apresentem alguma alteração no colo uterino. Vale a pena ressaltar que esse tipo de teste possui baixo custo relativo, mas a necessidade de repetições frequentes influencia na elegibilidade desse método para rastreamento desse tipo de lesão[17].

Dessa forma, existem controvérsias, na literatura, quanto à utilização desse exame como triagem única na detecção de lesões precursoras do câncer do colo uterino, principalmente na detecção de adenocarcinomas e de suas lesões precursoras, situação na qual esse teste não se mostrou suficientemente sensível. Entretanto, quando bem realizado, o que inclui coleta, processamento e leitura das lâminas, esse exame ainda é de fundamental importância no rastreamento do câncer do colo uterino e de suas lesões precursoras[18-21].

Positividade para HPV

Nas duas últimas décadas, o estabelecimento do HPV como agente etiológico do câncer do colo uterino promoveu o desenvolvimento de diversas metodologias utilizadas para sua detecção. Dessa forma, além do teste de Papanicolaou, a detecção da presença do HPV é atualmente utilizada na triagem de lesões do colo uterino em países como Holanda. A pesquisa do DNA de HPV é considerada altamente eficaz na detecção de lesões de alto grau, uma vez que a grande maioria delas é positiva para HPV de alto risco. Além disso, esse tipo de teste pode ser realizado concomitantemente ao exame de Papanicolaou e auxiliar na determinação do diagnóstico e do tratamento de lesões precursoras de baixo grau que não apresentaram alterações evidentes na avaliação citológica. Finalmente, esse método pode ser utilizado no acompanhamento de possíveis recidivas após o tratamento de lesões precursoras de alto grau e do câncer do colo uterino[22,23]. Características epidemiológicas da infecção por HPV geram controvérsias sobre a utilização desse tipo de triagem. Em razão da alta prevalência de infecções assintomáticas, a mera detecção do HPV de alto risco tem baixo valor preditivo positivo para a presença da displasia do colo uterino, uma vez que as taxas de prevalência para esse tipo viral em mulheres sem lesões variam de 20 a 40%[24]. Por outro lado, como a persistência da infecção por HPV de alto risco e o câncer do colo uterino estão diretamente relacionados, os testes negativos para a presença viral conferem alto valor preditivo negativo para o desenvolvimento dessa doença. Dessa forma, testes negativos para a presença de HPV de alto risco tornam-se de suma importância para a triagem de mulheres que apresentam esfregaço do colo uterino alterado[25].

Tecnologias que permitam detectar e quantificar os transcritos dos oncogenes virais E6 e E7 são estratégias atuais que visam avaliar a atividade oncogênica viral. Os principais eventos que provocam a transformação do epitélio do colo uterino são desencadeados pela expressão desregulada dos oncogenes virais E6 e E7 dos HPV de alto risco nas células replicativas basais e parabasais do epitélio infectado. Diversos estudos revelam um padrão complexo de interações das oncoproteínas E6 e E7 com proteínas celulares

envolvidas no controle do ciclo celular, apoptose, diferenciação epitelial e homeostase/estabilidade cromossômicas, confirmando o papel do HPV na carcinogênese viral[26]. Em vista disso, a detecção do RNA de HPV de alto risco é considerada atualmente um dos principais fatores de risco na triagem de lesões de alto grau com maior probabilidade de progredir para câncer do colo uterino. Vale a pena citar que a grande maioria das infecções promovidas por esse vírus é eliminada em aproximadamente um ano e que apenas uma baixa porcentagem delas persiste, induzindo lesões displásicas que podem progredir para o câncer. O DNA viral pode ser detectado desde lesões benignas – por exemplo, condiloma acuminado – até lesões malignas. Por esse motivo, a pesquisa dos transcritos E6 e E7 de HPV de alto risco aumentaria a especificidade e a sensibilidade desses testes na triagem de lesões com maior probabilidade de progredirem, quando comparada à simples detecção de DNA de HPV[27].

IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES ASSOCIADOS À EXPRESSÃO DESREGULADA DOS ONCOGENES DE HPV

A detecção de alterações celulares originadas pela expressão desregulada das oncoproteínas virais pode vir a caracterizar marcadores de progressão tumoral e contribuir, dessa forma, para a identificação de populações celulares com maior risco de progredirem para o câncer do colo uterino. A identificação e o estabelecimento do padrão de alteração desses fatores poderão definir marcadores com alto poder preditivo positivo. A utilização desses marcadores complementará o resultado de outros exames de triagem na identificação de lesões com maior risco de progressão maligna[22]. As principais linhas de investigação associadas aos aspectos anteriormente mencionados focam, principalmente, a identificação de proteínas celulares/teciduais ou circulantes, cuja expressão encontre-se alterada em resposta à expressão das oncoproteínas virais; a pesquisa de alterações no padrão de metilação de diversos genes celulares que poderão predizer eficientemente a iniciação neoplásica; modificações nos cromossomos e/ou no genoma viral em regiões distintas e reconhecidamente modificadas pelo evento da integração viral e a identificação de polimorfismos de genes associados a um melhor prognóstico. A seguir, serão discutidos avanços recentes sobre a identificação de biomarcadores potenciais associados ao câncer do colo uterino e sua possível utilização na triagem dessa doença.

Avaliação dos níveis de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular

A infecção pelo HPV promove a replicação desregulada do genoma hospedeiro. Dessa forma, diversas proteínas envolvidas no controle do ciclo celular têm seus níveis aumentados ou diminuídos. Assim, diversos estudos visam à análise dos níveis de proteínas relacionadas com esse evento. Entre elas, os principais exemplos descritos na literatura são p53, $p16^{INK4a}$, MCM2-7, EGFR, ciclinas D e E, $p21^{WAF1}$, $p27^{KIP1}$, entre outras[19,22,28]. O maior número de estudos encontrados na literatura foca a avaliação dos níveis da proteína $p16^{INK4a}$ em amostras do colo uterino tanto em cortes histológicos como em amostras derivadas de esfregaços cervicais. Sabe-se que as proteínas E6 e E7 de HPV promovem a degradação das proteínas supressoras de tumor p53 e pRb celulares, respectivamente. Essa interferência ativa um processo de retroalimentação negativo, que resulta na expressão exacerbada da proteína inibitória dos complexos de quinases dependentes de ciclina[29], $p16^{INK4a}$. Diversos estudos descrevem o aumento da expressão dessa proteína em lesões de alto grau e em câncer do colo uterino em praticamente 100% das amostras analisadas, contrariamente ao observado no epitélio normal da mucosa do colo uterino, onde a $p16^{INK4a}$ praticamente não é detectada. Aproximadamente 60% das lesões intraepiteliais de

baixo grau são fortemente positivas para $p16^{INK4a}$ (células proliferativas da camada basal e/ou parabasal), ao passo que as 40% restantes não apresentam níveis detectáveis dessa proteína, apesar de serem positivas para o DNA de HPV e apresentarem características morfológicas associadas à infecção (coilocitose, entre outros). Essa observação sugere que apenas uma parte das lesões de baixo grau infectadas por HPV apresenta a expressão desregulada das oncoproteínas virais nas células basais e parabasais, ao passo que, nas lesões negativas para $p16^{INK4a}$, a expressão dessas oncoproteínas seria muito baixa ou até mesmo nula nesse tipo celular. Dessa forma, as lesões de baixo grau que não apresentassem níveis elevados de $p16^{INK4a}$ nas células da camada basal e/ou suprabasal teriam menor probabilidade de progredirem para lesões de alto grau ou câncer. Vale a pena ressaltar que níveis elevados de $p16^{INK4a}$ estão associados a lesões infectadas por HPV de alto risco. O mesmo efeito não é observado nas lesões positivas para HPV de baixo risco[30-34]. A análise dessa proteína em amostras originadas de esfregaços do colo uterino mostrou aumento de expressão de $p16^{INK4a}$ em 98% das amostras derivadas de lesões de alto grau. Dessa forma, além da pesquisa dessa proteína em biópsias do colo uterino, sua pesquisa em esfregaços poderia ser uma opção na triagem primária de lesões do colo uterino, cuja classificação não tenha sido determinada mediante citologia oncótica[26,30]. Diversos estudos prospectivos estão em andamento para confirmar a possível utilização da proteína $p16^{INK4a}$ no rastreamento inicial do câncer do colo uterino e de suas lesões precursoras.

MARCADORES DE INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA

Aneuploidia do DNA hospedeiro

Alguns estudos mostram que a desregulação da expressão dos oncogenes virais promove instabilidade genômica nas células hospedeiras. A principal característica observada é a presença de aneuploidia, ou seja, alteração do número de cromossomos presentes nas células. Consequentemente, a aneuploidia caracterizaria lesões HPV-positivas, incluindo, dessa forma, aquelas precursoras e o câncer. Alguns estudos indicam que a presença de aneuploidia precede a integração viral no genoma do hospedeiro em lesões displásicas avançadas, inferindo que a integração viral seria uma consequência, e não a causa, da instabilidade cromossômica[35,36].

Integração do HPV

Acredita-se que o DNA do HPV integre-se aleatoriamente ao genoma hospedeiro durante o processo de reparo, que é desencadeado após o surgimento de quebras na dupla fita de DNA do genoma celular. A integração viral seria um indicador de instabilidade genômica durante o processo de transformação celular, uma vez que 80 a 90% das amostras originadas de câncer cervical apresentam DNA de HPV integrado[37]. Diversas metodologias são descritas e utilizadas para a detecção da integração do DNA de HPV no genoma viral, por exemplo, a técnica de PCR em tempo real, que permite obter uma razão entre os níveis dos genes E2 (frequentemente interrompido na integração viral) e E6/E7 de HPV. Quando não integrado, o genoma viral apresentaria uma razão de 1:1 entre os genes E2 e E6/E7. Já na integração do genoma viral, ocorreria diminuição na detecção do gene E2[38]. Contudo, uma porcentagem significativa de lesões de baixo e alto graus apresenta cópias do HPV em sua forma epissomal, além de cópias integradas. Esse aspecto interfere na quantificação direta do número de cópias virais integradas. Além disso, alguns estudos avaliam o sítio de integração do HPV no genoma viral. Essa metodologia poderia ser válida no acompanhamento de mulheres após tratamento prévio, uma vez que o sítio de integração identificado poderia ser utilizado como um marcador tumoral em uma possível recidiva[39].

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS E EVENTOS EPIGENÉTICOS

Polimorfismo no gene p53

Na última década, diversos estudos associaram a presença de polimorfismos no códon 72 do gene p53 a um melhor ou pior prognóstico em pacientes com carcinomas epidermoides do colo uterino. Dados mostraram que a proteína p53 contendo o aminoácido arginina na posição 72 é mais suscetível à degradação promovida por E6 do que a proteína contendo o aminoácido prolina nessa mesma posição. Além disso, esse mesmo estudo verificou que pacientes homozigotos para arginina tinham maior risco de desenvolver lesão maligna associada ao HPV quando comparados aos portadores heterozigotos e homozigotos para prolina[40,41]. Esses dados, entretanto, são alvo de grande controvérsia, uma vez que as observações realizadas por diversos estudos são contraditórias[42-44].

Avaliação de eventos epigenéticos

A metilação é o principal fenômeno epigenético pelo qual um gene é silenciado, sendo um importante meio de regulação da expressão gênica. Esse processo ocorre mediante a adição de um radical metila, ligado covalentemente às citosinas presentes na estrutura do DNA. Locais particularmente suscetíveis ao efeito da metilação são os dinucleotídios CpG, que contêm as bases citosina e guanina adjacentes. A maioria desses dinucleotídios localiza-se em pequenas regiões denominadas ilhas CpG, que, em células normais, estão desmetiladas. Em geral, essas regiões são observadas nas sequências regulatórias presentes na extremidade 5′ de cada gene, onde se localizam os promotores gênicos. A metilação dessas regiões interrompe a transcrição dos genes por meio do silenciamento de seus promotores.

Além disso, esse evento também pode ser observado na estrutura das histonas (proteínas associadas às moléculas de DNA e que determinam o grau de compactação da cromatina). Uma vez adicionado o radical metila nas citosinas, ocorre a deacetilação das histonas, tornando a cromatina mais condensada e, portanto, inacessível à maquinaria de transcrição. Outra função normal desse tipo de alteração epigenética é a proteção do genoma do hospedeiro em frente das sequências de DNA pertencentes a outros organismos (por exemplo, DNA de origem viral), que podem ser inativados mediante a adição de radicais metila.

Por outro lado, existem algumas situações em que a metilação contribui para processos patogênicos. Entre eles, o mais amplamente estudado é o câncer. Atualmente, considera-se que a hipermetilação de determinadas regiões do DNA seja um fator diretamente relacionado com a formação tumoral. Esse evento pode interferir de diversas formas no processo de carcinogênese. Um dos principais exemplos é a metilação de regiões promotoras de genes supressores de tumor. A principal função das proteínas originadas dos genes supressores de tumor é o controle da proliferação celular. Dessa forma, a perda desse tipo de regulação está diretamente relacionada com os processos neoplásicos. A hipermetilação da região 5′ do gene que codifica para a pRB é um dos principais exemplos descritos na literatura sobre o silenciamento de um gene supressor de tumor e o processo de carcinogênese. Ainda não estão bem definidos os fatores que levam à metilação de alguns genes apenas em determinados tipos celulares. Sabe-se que células senescentes e/ou que sofreram ação de fatores ambientais, como radiação, fumo, exposição a determinados vírus, entre outros aspectos, apresentam maior incidência de hipermetilação em genes associados ao processo neoplásico[45].

Em tumores do colo uterino, a metilação de diversos genes é descrita. Os principais exemplos são *DcR1/DcR2, hTERT, p73, p16, PTEN, E-caderina, APC, MGMT, FANCF, BRAC1, hMLH1, RASSF1A, DAPK, TSLC1, FHIT, HIC1, RARβ, TIMP2/TIMP3, CAV-1, Erα*, entre outros. Os resultados desses estudos não determinam um padrão estabelecido de metilação em um amplo grupo de amostras, mas prometem contribuir no prognóstico de tumores do colo uterino[26,46].

ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA

Na literatura, existem diversos estudos que visaram identificar genes diferencialmente expressos entre linhagens imortalizadas/transformadas com HPV ou amostras do colo uterino, com a utilização da técnica de *cDNA microarray.* Entre eles, foram comparadas linhagens tumorigênicas e não tumorigênicas HPV 16-positivas, com a identificação de 49 genes diferencialmente expressos. Por exemplo, o gene C4.8, cuja proteína está associada à proliferação celular, estando sua expressão aumentada em lesões de alto grau[47,48]. Outros estudos visaram compor assinaturas gênicas capazes de diferenciar um tecido normal do colo uterino de cânceres de diferentes estágios. Além disso, mediante essas assinaturas, os autores puderam diferenciar carcinomas do colo uterino estágios Ib e IIb, além de predizer sua resposta à radioterapia[49]. Um estudo comparando o perfil de expressão gênica entre carcinomas cervicais e queratinócitos normais identificou mais de 500 genes diferencialmente expressos, entre eles alguns biomarcadores já descritos em estudos da transformação mediada por HPV, como CDKN2A/p16^{INK4a}, topoisomerase 2A, entre outros possíveis biomarcadores[50]. Finalmente, um estudo identificou como diferencialmente expressos os transcritos da calicreína 7 e da superóxido dismutase 2, quando comparadas linhagens imortalizadas com HPV 16 e 18 a culturas primárias de queratinócitos normais[51].

ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS SÉRICAS

Marcadores circulantes identificados mediante a técnica SELDI

Estudos recentes utilizaram uma abordagem baseada nos estudos de proteômica, denominada SELDI, para identificar biomarcadores circulantes em mulheres com câncer cervical. De fato, essa técnica permite o rastreamento de centenas de proteínas diferencialmente expressas presentes em fluidos corporais, como plasma, saliva, urina, entre outros. Alguns estudos descrevem perfis de proteínas plasmáticas capazes de discriminar pacientes com e sem câncer do colo uterino, com sensibilidade e especificidade que variam de 87 a 92% e 97 a 100%, respectivamente[52,53]. Esses estudos ainda não são conclusivos, mas prometem identificar proteínas circulantes diferencialmente expressas quando comparados soros de mulheres que possuem ou não câncer do colo uterino.

Além disso, outros marcadores circulantes foram analisados para detectar esse tipo de câncer. Entre eles, as proteínas IGF-2, VEGF-C e o CIFRA[54-56]. Recentemente, a metilação dos genes CDH1 e CDH2 foi analisada em amostras séricas[57]. Vale ressaltar que esses marcadores ainda estão em estudo e necessitam de avaliações adicionais.

Resposta humoral contra HPV

A análise de anticorpos circulantes contra antígenos do HPV não é utilizada como ferramenta na triagem de câncer cervical, uma vez que não existem testes padronizados com essa finalidade. Contudo, o desenvolvimento de novas técnicas que possibilitem a ampla avaliação dos antígenos de HPV abre novas possibilidades para sua utilização, não apenas no rastreamento de lesões e câncer do colo uterino associados ao HPV, como também no monitoramento após aplicação de vacinas profiláticas[12,58,59].

Marcadores circulantes adicionais com potencial utilização na clínica

A Academia Nacional de Bioquímica Clínica[60-62] cita apenas três possíveis marcadores que podem contribuir na clínica para complementação do seguimento da paciente após tratamento do câncer cervical. Para carcinomas epidermoides, o SCCA é o mais indicado. Essa proteína é uma subfração de TA-4, um antígeno associado a tumores e que pertence à família dos inibidores

de serinoproteases. Na maioria dos estudos, o SCCA total é mensurado para determinar a conduta clínica, entretanto sua utilização ainda se encontra repleta de controvérsias. Níveis séricos de SCCA foram correlacionados com estágio e tamanho tumoral, tumor residual após tratamento, doença recorrente ou em progressão e sobrevida em pacientes com carcinomas epidermoides. Vale a pena ressaltar que esse marcador não é suficientemente sensível para detectar 100% das lesões precursoras e avançadas do colo uterino. Aproximadamente 60% das mulheres com lesões precursoras do colo uterino apresentam níveis significativos desse marcador. Além disso, níveis elevados dessa proteína são detectados em outros tipos tumorais, por exemplo, carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço, esôfago e pulmão[63,64].

Além desse marcador, o CEA e o CA-125 são utilizados com cautela em pacientes com adenocarcinomas do colo uterino, mas, até o presente momento, não existem condutas estabelecidas utilizando esses marcadores. Vale a pena ressaltar que, apesar dos inúmeros esforços na procura de marcadores circulantes, nenhum deles mostrou utilidade clínica comparável ou superior às análises realizadas diretamente nos esfregaços derivados do colo uterino.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Atualmente, além do teste de Papanicolaou, diversos biomarcadores associados ao câncer cervical estão sendo analisados. Os dados mais contundentes são associados à detecção persistente do genoma de HPV de alto risco. Além disso, tanto o estudo da expressão de $p16^{INK4a}$, por meio de imunoistoquímica, como a avaliação dos transcritos de E6/E7 dos HPV dos tipos 16, 18, 31, 33 e 45 em amostras da cérvice uterina tornaram-se bastante populares entre os citopatologistas e os colposcopistas. Outros biomarcadores possuem potencial elevado, mas, como ainda não foram avaliados em grandes ensaios clínicos, perdem sua possível utilização na prática clínica. Considerando-se a rápida evolução e o aprimoramento de técnicas e estudos que permitem analisar modificações e alterações celulares em larga escala, acredita-se que a análise simultânea utilizando diversos biomarcadores possa contribuir para a determinação de sua eficiência em um futuro próximo.

Referências

1. SRINIVAS, P. R.; KRAMER, B. S.; SRIVASTAVA, S. Trends in biomarker research for cancer detection. **Lancet Oncol.**, v. 2, n. 11, p. 698-704, 2001.
2. ZUR-HAUSEN, H. Pappilomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-350, 2002.
3. INCA – Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: http://www.inca.gov.br.
4. BOSCH, F. X.; BURCHELL, A. N.; SCHIFFMAN, M. et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. **Vaccine**, v. 26, n. 10, p. 1-16, 2008.
5. IARC – International Agency for Research on Cancer-World Health Organization. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans:** human papillomaviruses. Lyon: Human papillomavirus. v. 90, 2007. Disponível em: <URL:http://www-dep.iarc.fr/>.
6. HARPER, D. M.; FRANCO, E. L.; WHEELER, C. et al. GlaxoSmithkline HPV vaccine study group. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 364, n. 9447, p. 1757-1765, 2004.
7. HARPER, D. M.; FRANCO, E. L.; WHEELER, C. M. et al. HPV vaccine study group. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. **Lancet**, v. 367, n. 9518, p. 1247-1255, 2006.
8. VILLA, L. L.; COSTA, R. L.; PETTA, C. A. et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. **Lancet Oncol.**, v. 6, n. 5, p. 271-278, 2005.
9. GARLAND, S. M.; HERNANDEZ-AVILA, M.; WHEELER, C. M. et al. Females United to Unilaterally Reduce Endo/Ectocervical Disease (FUTURE) I Investigators. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, n. 19, p. 1928-1843, 2007.
10. VILLA, L. L.; COSTA, R. L.; PETTA, C. A. et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. **Br. J. Cancer**, v. 95, p. 1459-1466, 2006.
11. SCHWARZ, T. F.; LEO, O. Immune response to human papillomavirus after prophylactic vaccination with AS04--adjuvanted HPV-16/18 vaccine: improving upon nature. **Gynecol. Oncol.**, v. 110, n. 1, p. 1-10, 2008.
12. LEPIQUE, A. P.; RABACHINI, T.; VILLA, L. L. HPV vaccination: the beginning of the end of cervical cancer? – a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 1-10, 2009.

13. SPITZER, M.; APGAR, B. S.; BROTZMAN, G. L. Management of histologic abnormalities of the cervix. **Am. Fam. Physician**, v. 73, n. 1, p. 105-112, 2006.
14. WRIGHT, T. C. JR.; COX, J. T.; MASSAD, L. S. et al. American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 189, n. 1, p. 295-304, 2003.
15. SOLOMON, D.; DAVEY, D.; KURMAN, R. et al. The 2001 Bethesda system: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**, v. 287, n. 16, p. 2114-2119, 2002.
16. WRIGHT, T. C. JR.; SCHIFFMAN, M.; SOLOMON, D. et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. **Obstet. Gynecol.**, v. 103, n. 2, p. 304-309, 2004.
17. KITCHENER, H. C.; CASTLE, P. E.; COX, J. T. Chapter 7: achievements and limitations of cervical cytology screening. **Vaccine**, v. 3, p. 63-70, 2006.
18. KOSS, L. G. Testing in cervicovaginal cytology. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 130, n. 1, p. 13, 2006.
19. VON KNEBEL-DOEBERITZ, M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. **Eur. J. Cancer**, v. 38, n. 17, p. 2229-2242, 2002.
20. SASIENI, P. D.; CUZICK, J.; LYNCH-FARMERY, E. Estimating the efficacy of screening by auditing smear histories of women with and without cervical cancer. The National Co-ordinating Network for Cervical Screening Working Group. **Br. J. Cancer**, v. 73, n. 8, p. 1001-1005, 1996.
21. DUARTE-FRANCO, E.; FRANCO, E. L. Cancer of the uterine cervix. **BMC Womens Health**, v. 4, p. S13, 2004.
22. VON KNEBEL-DOEBERITZ, M.; SYRJANEN, K. J. Molecular markers: how to apply in practice. **Gynecol. Oncol.**, v. 103, n. 1, p. 18-20, 2006.
23. ARBYN, M.; SASIENI, P.; MEIJER, C. J. et al. Chapter 9: clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. **Vaccine**, v. 3, p. 78-89, 2006.
24. CASTELLSAGUÉ, X.; SANJOSÉ, S.; AGUADO, T. et al. HPV and cervical cancer in the world 2007 report. **Vaccine**, v. 25, p. 3, 2007.
25. SOLOMON, D.; SCHIFFMAN, M.; TARONE, R. ALTS study group. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 93, n. 4, p. 293-299, 2001.
26. WENTZENSEN, N.; VON KNEBEL-DOEBERITZ, M. Biomarkers in cervical cancer screening. **Dis. Markers**, v. 23, n. 4, p. 315-330, 2007.
27. DUENSING, S.; MUNGER, K. Centrosome abnormalities, genomic instability and carcinogenic progression. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1471, n. 2, p. M81-M88, 2001.
28. DUENAS-GONZALEZ, A.; LIZANO, M.; CANDELARIA, M. et al. Epigenetics of the uterin collum cancer. An overview and therapeutic perspectives. **Mol. Cancer**, v. 4, p. 38, 2005.
29. KHLEIF, S. N.; DEGREGORI, J.; YEE, C. L. et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 9, p. 4350-4354, 1996.
30. WENTZENSEN, N.; BERGERON, C.; CAS, F. et al. Evaluation of a nuclear score for p16INK4a-stained cervical squamous cells in liquid-based cytology samples. **Cancer**, v. 105, n. 6, p. 461-467, 2005.
31. WANG, S. S.; TRUNK, M.; SCHIFFMAN, M. et al. Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 13, n. 8, p. 1355-1360, 2004.
32. KLAES, R.; FRIEDRICH, T.; SPITKOVSKY, D. et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. **Int. J. Cancer**, v. 92, n. 2, p. 276-284, 2001.
33. SANO, T.; OYAMA, T.; KASHIWABARA, K. et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. **Am. J. Pathol.**, v. 153, n. 6, p. 1741-1748, 1998.
34. BAHNASSY, A. A.; ZEKRI, A. R.; SALEH, M. et al. The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma carcinoma. **BMC Clin. Pathol.**, v. 24, n.7, p. 4, 2007.
35. DUENSING, S.; DUENSING, A.; FLORES, E. R. et al. Centrosome abnormalities and genomic instability by episomal expression of human papillomavirus type 16 in raft cultures of human keratinocytes. **J. Virol.**, v. 75, n. 16, p. 7712-7716, 2001.
36. DUENSING, S.; MÜNGER, K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. **Cancer Res.**, v. 62, n. 23, p. 7075-7082, 2002.
37. WENTZENSEN, N.; RIDDER, R.; KLAES, R. et al. Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions. **Oncogene**, v. 21, n. 3, p. 419-426, 2002.
38. PEITSARO, P.; JOHANSSON, B.; SYRJÄNEN, S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 3, p. 886-891, 2002.
39. VINOKUROVA, S.; WENTZENSEN, N.; EINENKEL, J. et al. Clonal history of papillomavirus-induced dysplasia in the female lower genital tract. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 97, v. 24, p. 1816-1821, 2005.
40. STOREY, A.; THOMAS, M.; KALITA, A. et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. **Nature**, v. 21, n. 6682, p. 229-234, 1998.
41. KOUSHIK, A.; PLATT, R. W.; FRANCO, E. L. p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 13, n. 1, p. 11-22, 2004.
42. BRENNA, S. M.; SILVA, I. D.; ZEFERINO, L. C. et al. Prognostic value of P53 codon 72 polymorphism in invasive of the uterin collum cancer in Brazil. **Gynecol. Oncol.**, v. 93, n. 2, p. 374-380, 2004.
43. MAKNI, H.; FRANCO, E. L.; KAIANO, J. et al. p53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. **Int. J. Cancer**, v. 87, n. 4, p. 528-533, 2000.
44. HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M.; BRINTON, L. A. et al. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. **Nature**, v. 10, n. 6711, p. 531-532, 1998.

45. FENG, Q.; HAWES, S. E.; STERN, J. E. et al. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from patients with cervical neoplasia. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 16, n. 6, p. 1178-1184, 2007.
46. YANG, H. J.; LIU, V. W.; WANG, Y. et al. Differential DNA methylation profiles in gynecological cancers and correlation with clinico-pathological data. **BMC Cancer**, v. 6, p. 212, 2006.
47. NEES, M.; VAN WIJNGAARDEN, E.; BAKOS, E. et al. Identification of novel molecular markers which correlate with HPV-induced tumor progression. **Oncogene**, v. 16, n. 19, p. 2447-2458, 1998.
48. WOLLSCHEID, V.; KÜHNE-HEID, R.; STEIN, I. et al. Identification of a new proliferation-associated protein NET-1/C4.8 characteristic for a subset of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinomas. **Int. J. Cancer**, v. 99, n. 6, p. 771-775, 2002.
49. WONG, Y. F.; SELVANAYAGAM, Z. E.; WEI, N. et al. Expression genomics of cervical cancer: molecular classification and prediction of radiotherapy response by DNA microarray. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, n. 15, p. 5486-5492, 2003.
50. SANTIN, A. D.; ZHAN, F.; BIGNOTTI, E. et al. Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. **Virology**, v. 331, n. 2, p. 269-291, 2005.
51. TERMINI, L.; BOCCARDO, E.; ESTEVES, G. H. et al. Characterization of global transcription profile of normal and HPV-immortalized keratinocytes and their response to TNF treatment. **BMC Med. Genomics**, v. 1, n. 29, 2008.
52. WONG, Y. F.; CHEUNG, T. H.; LO, K. W. et al. Protein profiling of cervical cancer by protein-biochips: proteomic scoring to discriminate cervical cancer from normal cervix. **Cancer Lett.**, v. 211, n. 2, p. 227-234, 2004.
53. LIN, Y. W.; LAI, H. C.; LIN, C. Y. et al. Plasma proteomic profiling for detecting and differentiating in situ and invasive carcinomas of the uterine cervix. **Int. J. Gynecol. Cancer**, v. 16, n. 3, p. 1216-1224, 2006.
54. MATHUR, S. P.; MATHUR, R. S.; GRAY, E. A. et al. Serum vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) as a specific biomarker for advanced cervical cancer: relationship to insulin-like growth factor II (IGF-II), IGF binding protein 3 (IGF-BP3) and VEGF-A. **Gynecol. Oncol.**, v. 98, n. 3, p. 467-483, 2005.
55. MITSUHASHI, A.; SUZUKA, K.; YAMAZAWA, K. et al. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C levels as tumor markers in patients with cervical carcinoma. **Cancer**, v. 103, n. 4, p. 724-730, 2005.
56. MOLINA, R.; FILELLA, X.; AUGE, J. M. et al. CYFRA 21.1 in patients with cervical cancer: comparison with SCC and CEA. **Anticancer Res.**, v. 25, n. 3A, p. 1765-1771, 2005.
57. WIDSCHWENDTER, A.; IVARSSON, L.; BLASSNIG, A. et al. CDH1 and CDH13 methylation in serum is an independent prognostic marker in cervical cancer patients. **Int. J. Cancer**, v. 109, n. 2, p. 163-166, 2004.
58. SILINS, I.; AVALL-LUNDQVIST, E.; TADESSE, A. et al. Evaluation of antibodies to human papillomavirus as prognostic markers in cervical cancer patients. **Gynecol. Oncol.**, v. 85, n. 2, p. 333-338, 2002.
59. WATERBOER, T.; SEHR, P.; MICHAEL, K. M. et al. Multiplex human papillomavirus serology based on in situ-purified glutathione s-transferase fusion proteins. **Clin. Chem.**, v. 51, n. 10, p. 1845-1853, 2005.
60. GAARENSTROOM, K. N.; BONFRER, J. M. G. National Academy of Clinical Biochemistry – Guidelines for the Use of Tumor Markers in Cervical Cancer. (Section 3J). p. 1-16, 2006. Disponível em: http://www.aacc.org/.
61. DIAMANDIS, E. P.; HOFFMAN, B. R.; STURGEON, C. M. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for the Use of Tumor Markers. **Clin. Chem.**, v. 54, n. 11, p. 1935-1939, 2008.
62. Guidelines for the Use of Tumor Markers. Disponível em: http://www.aacc.org/.
63. ESAJAS, M. D.; DUK, J. M.; DE BRUIJN, H. W. et al. Clinical value of routine serum squamous cell carcinoma antigen in follow-up of patients with early-stage cervical cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 19, n. 19, p. 3960-3966, 2001.
64. HSU, K. F.; HUANG, S. C.; SHIAUZ, A. I. et al. Increased expression level of squamous cell carcinoma antigen 2 and 1 ratio is associated with poor prognosis in early-stage uterine cervical cancer. **Int. J. Gynecol. Cancer**, v. 17, n. 174-181, 2007.

Índice Remissivo

A

B

C

As letras *f* e *t* que se seguem aos números de páginas significam, respectivamente, *figura* e *tabela*.

L

M

N

O

P

Q

R

S

T

U

V

GEOGRÁFICA _ 2014/2